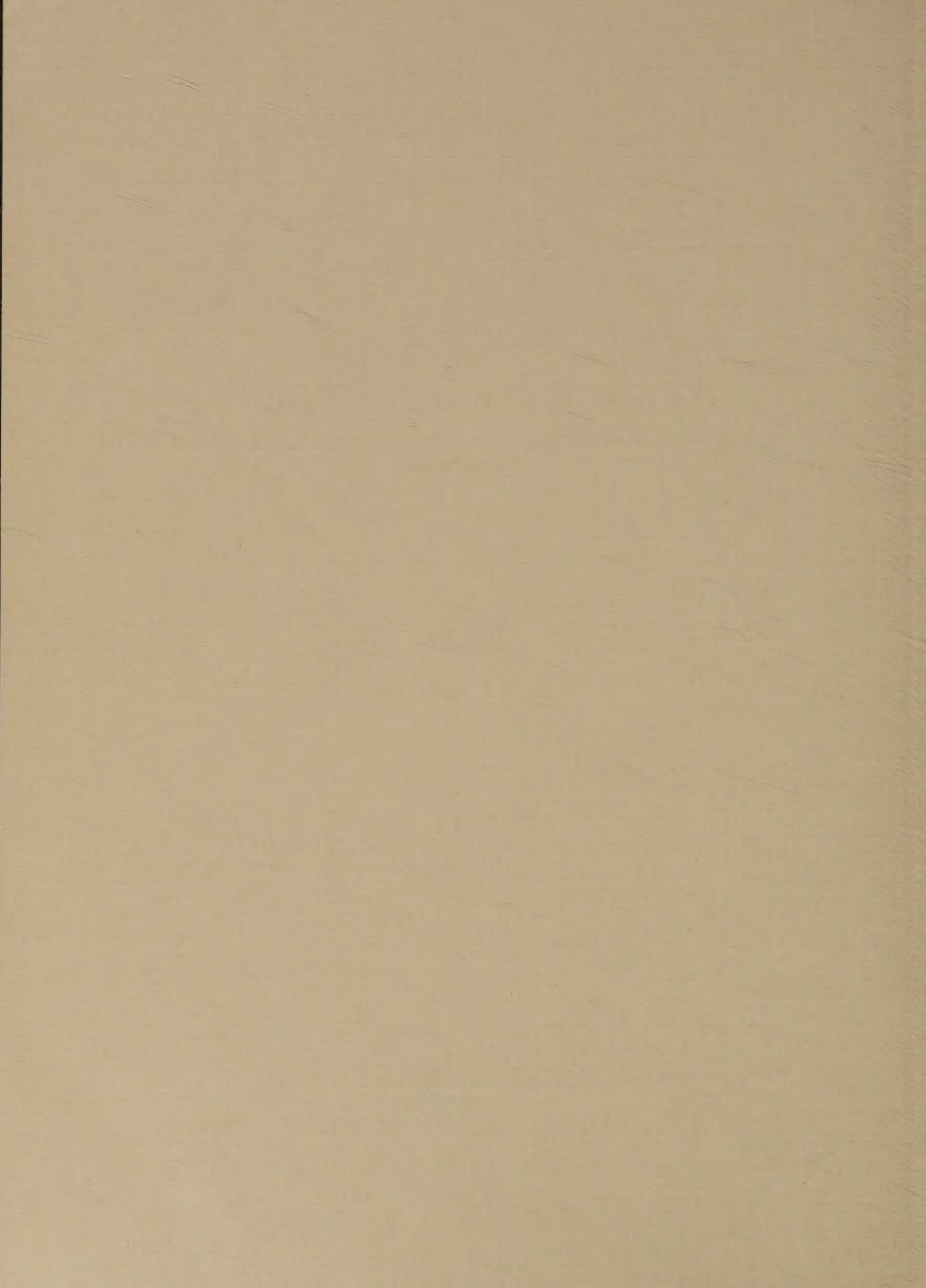


**KALORISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN ZELL-MODELLEN UND BIOLOGISCHEN ZELLEN**

**EIN BEITRAG ZUM VERSTÄNDNIS DES THERMODYNAMISCHEN ZUSTANDES
DES ZYTOPLASMAS**

Günther Hasl

1973 # 283



Aus dem Institut für Physikalische und Medizinische Strahlenkunde
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. med., Dr. phil. nat. H. Pauly

KALORISCHE UNTERSUCHUNGEN AN ZELL-MODELLEN UND BIOLOGISCHEN ZELLEN

EIN BEITRAG ZUM VERSTÄNDNIS DES THERMODYNAMISCHEN ZUSTANDES DES ZYTOPLASMAS



Der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
als Habilitationsschrift

vorgelegt

von

Günther Hasl

Aus dem Institut für Physiologie und Medizinische Zoologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. nat. H. Pavy

KALORISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN ZELL-MODELLEN UND BIOLOGISCHEN ZELLEN
EIN BEITRAG ZUM VERSTÄNDNIS DES THERMODYNAMISCHEN ZUSTANDES
DES ZYTOPLASMAS



Der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
als Habilitationsschrift

Tag der Habilitation: 26. Juli 1973

Günther Hatzl

Gliederung

1. Einleitung und Problemstellung	1 - 3
1.10 Vorbemerkungen	3 - 11
2. Thermodynamische Eigenschaften von Mischungen	11 - 16
3. Untersuchungen der kalorischen Eigenschaften des Wassers in Modellösungen	16 - 72
3.10 Meßverfahren und Eichung des Kalorimeters	16 - 20
3.20 Herstellung der Mischungen	20 - 22
3.21 Wasser-Protein-Gemische	20 - 21
3.22 Wasser-Protein-Salz-Gemische	21 - 22
3.30 Ergebnisse der Untersuchungen an Modellösungen	23 - 41
3.31 Kalorische Eigenschaften einer Protein-Wasser-Mischung	23 - 29
3.32 Analyse einer Protein-Wasser-Mischung mit Hilfe der Theorie binärer Mischungen	30 - 32
3.33 Kalorische Eigenschaften einer Protein-Wasser-Salz-Mischung	32 - 39
3.34 Analyse einer Protein-NaCl-Wasser-Mischung mit Hilfe der Theorie ternärer Mischungen	39 - 41
3.40 Diskussion der Ergebnisse an Modellsystemen	42 - 72
3.41 Kalorische Eigenschaften einer Protein-Wasser-Mischung	42 - 57
3.42 Kalorische Eigenschaften der Protein-Komponente im Gemisch	57 - 60
3.43 Kalorische Eigenschaften einer Protein-Salz-Wasser-Mischung	60 - 63

3.44	Abhängigkeit des "kalorisch gebundenen" Wassers von der mittleren Ladung des Rinder-serumalbumin-Moleküls	63 - 65
3.45	Die Partialenthalpie des Lösungsmittels im Gemisch	66 - 68
3.46	Partialenthalpie des RSA im Lösungsmittel-Protein-Gemisch	68 - 72
4.	Untersuchungen der kalorischen Eigenschaften des Wassers in biologischen Zellen	73 - 103
4.10	Vorbemerkung	73 - 74
4.20	Vorbehandlung der biologischen Proben	75 - 78
4.21	Menschliche Erythrozyten in Kochsalzlösung und Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung unterschiedlicher Konzentration	75 - 76
4.22	Menschliche Erythrozyten in Salzlösungen mit Glyzerin als Gefrierschutz	77 - 78
4.30	Ergebnisse der kalorischen Untersuchungen an Erythrozyten	79 - 87
4.31	Kalorische Eigenschaften von gefrorenen Erythrozyten	79 - 82
4.32	Kalorische Eigenschaften von gefrorenen Erythrozyten nach Zugabe von Gefrierschutzmittel in das Suspensionsmedium	82 - 87
4.40	Diskussion der Ergebnisse der Untersuchungen an biologischen Zellen	88 - 103
4.41	Kalorische Eigenschaften von gefrorenen Erythrozyten in Salzlösungen	88 - 96
4.41a	Vorbemerkungen	88 - 88
4.41b	Osmotischer Wassertransport	89 - 90

4.41c Ausfrieren des Zellwassers	90 - 92
4.41d Interpretation der Meßergebnisse	92 - 96
4.42 Kalorische Eigenschaften von gefrorenen Erythrozyten in Salzlösungen mit Gefrierschutzzusatz	96 - 103
4.42a Eigenschaften des Gefrierschutzmittels Glycerin	96 - 101
4.42b Osmotische Veränderungen	101 - 102
4.42c Die mittlere Enthalpiedifferenz von gefrorenen, glyzerinhaltigen Erythrozytensedimenten	102 - 103
5. Zusammenfassung	104 - 107
6. Literatur	108 - 115

1. Einleitung und Problemstellung

Bei einer Organverpflanzung oder bei einer Bluttransfusion hängt der Erfolg wesentlich mit davon ab, ob das Spenderorgan für den Empfänger geeignet ist und ob das Blut des Empfängers mit dem des Spenders verträglich ist. Eine Konservierung und Lagerung bestimmter Organtypen und Blutzusammensetzungen erhöht daher die Chance, bei einem lebensnotwendigen Organersatz oder erforderlichen Bluttransfusion die geeigneten Organe oder Blutzusammensetzungen bereit zu haben.

Die Organkonservierung und Lagerung wird bereits in beschränktem Umfang durchgeführt, befindet sich aber praktisch am Anfang des Versuchsstadiums. Mehr an Erfahrung liegt bei der Konservierung von Blut vor. Bei einer zeitlich auf wenige Wochen beschränkten Lagerung von Blut ist eine Temperatur von + 4 Grad C ausreichend. Eine längere Lagerung von Blut - über einen Zeitraum von Monaten und Jahren - ist nur bei einer Tiefkühlkonservierung möglich. Bei der Tiefkühlkonservierung wird das Blut mit oder ohne "Frostschutzmittel" eingefroren. Der Mechanismus der Schutzwirkung der "Gefrierschutzmittel" ist noch nicht vollkommen aufgeklärt und ist sicherlich von der Art der "Gefrierschutzmittel" abhängig. Die in der Praxis angewendeten verschiedenen "Gefrierschutzmittel" bei der Tiefkühlkonservierung bewirken, daß das Einfrieren des Blutes ohne größere Vorsichtsmaßnahmen erfolgen kann. Nach dem Auftauen wird das "Gefrierschutzmittel" vom Blut wieder abgetrennt. Danach sind die Blutkörperchen z. B. für Transfusionen geeignet.

Beim Einfrieren von Blut ohne "Gefrierschutzmittel" werden die Erythrozyten im allgemeinen zerstört und für eine weitere Verwendung unbrauchbar. Die im extrazellulä-

ren Raum einsetzende Eiskristallbildung führt zu einer Dehydration der Zelle. Mit diesem Wasserentzug der Zelle ist eine erhebliche Konzentrierung des Zellinhaltes verbunden, über deren Auswirkung im einzelnen unterschiedliche Vorstellungen existieren. Schließlich gefriert der gesamte Zellinhalt. Beim Abkühlen von Zellsedimenten bis auf eine Temperatur von etwa -50° C lassen sich jedoch keine Phasenübergänge nachweisen, die einem eutektischen Gemisch zugerechnet werden könnten. Solche Eutektika werden von Salzlösungen bei bestimmten Temperaturen gebildet und könnten daher durchaus auch beim Einfrieren von Zellen auftreten. Im allgemeinen hämolysieren diese Zellen nach dem Auftauen. Da aber die Ausbildung der Eiskristalle bei tiefen Temperaturen ein zeitabhängiger Vorgang ist, kann durch geeignete Wahl der Einfriereschwindigkeit die Eisbildung im extra- und intrazellulären Raum beeinflußt werden. Durch eine genügend hohe Einfriereschwindigkeit kann eine Dehydration der Zellen soweit reduziert werden, daß beim Einfrieren keine Schädigung der Zellen eintritt. Gelingt es beim Auftauen ebenfalls die Zellen vor irreversiblen Schäden zu bewahren, so kann dieses Blut - nach langer Lagerungszeit im gefrorenen Zustand - für medizinische Zwecke Verwendung finden. Der Zellinhalt zusammen mit dem Suspensionsmedium ist ein Vielkomponentensystem und für eine thermodynamische Analyse viel zu kompliziert. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit beginnen daher mit einem einfachen Modellsystem. Durch Einfrieren und Auftauen einer Protein-Wasser-Mischung werden die kalorischen Eigenschaften der beteiligten Komponenten untersucht. Von besonderem Interesse ist hierbei das "kalorisch gebundene" Wasser [23]. Dieses Wasser steht unter dem Einfluß der Wechselwirkungskräfte der Proteinmoleküle und ist so verändert, daß es keinen Phasenübergang fest flüssig wie das freie Wasser aufweist.

Das Protein-Wasser-Gemisch, ein Zweikomponentensystem, wird durch Zusatz von Salz zu einem Dreikomponentensystem erweitert. Das schon sehr komplizierte System ermöglicht eine Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Protein-, Wassermolekülen und Salzionen. Art und Zusammensetzung dieser Systeme sind so gewählt, daß sie als einfache Zytoplasmamodelle angesehen werden können, und unter bestimmten Voraussetzungen Rückschlüsse auf das Zytoplasma einer Zelle ermöglichen.

Die an den Modellsystemen durchgeführten Analysen werden anschließend auf biologische Systeme übertragen. Am Beispiel menschlicher Erythrozyten wird versucht, mit Hilfe der kalorischen Untersuchungsmethode den thermodynamischen Zustand des Wassers in einem Erythrozyten zu bestimmen. Weitere Versuche wurden unter Zugabe von Gefrierschutzmittel durchgeführt. Dieser Zusatz von Gefrierschutzmittel verringert eine Schädigung der Zellen, so daß die Zellen nach einer Kältebehandlung ihre normalen Funktionen in einer physiologischen Lösung wieder ausführen können.

Die an diesem biologischen System und Modellsystemen gewonnenen Ergebnisse werden miteinander verglichen und ein Modell des physikalisch-chemischen Zustandes des Zytoplasmas mit Hilfe des Begriffs der Komponenten einer Mischung diskutiert.

1.10 Vorbemerkungen

Zur Beschreibung einer Zelle gehören neben dem morphologischen und histologischen Aufbau, den in ihr ablaufenden biochemischen und physiologischen Vorgängen zur Erhaltung der Lebensfunktionen auch die Angabe der physikalisch-chemischen Zusammensetzung des Zellinhaltes. Es kann aber nicht allein genügen,

nur die Menge einer Substanz - z. B. die Menge Wasser im Zytoplasma - anzugeben. Neben der Kenntnis der Menge einer bestimmten Substanz müssen auch Angaben darüber gemacht werden, in welcher Beziehung diese Substanz zu den übrigen Bestandteilen des Zytoplasmas steht. Es ist dabei nicht von Anfang an zu erwarten, daß die physikalisch-chemischen Untersuchungsmethoden makromolekularer Lösungen, auf dieses komplizierte System Zytoplasma angewendet, zu brauchbaren Aussagen führen könnten.

Das Zytoplasma einer Zelle ist ein äußerst kompliziertes System, in dem sehr verwickelte Prozesse ablaufen. Aufgrund dieser sehr komplexen Vorgänge und der Vielfältigkeit der verschiedenen Zelltypen im mikroskopischen Erscheinungsbild wird von einigen Autoren [31, 67] dem Zytoplasma eine besondere Struktur zugeschrieben. Die makromolekularen Komponenten des Zytoplasma binden dabei einen Großteil des Wassers und bilden ein feinstrukturiertes Netzwerk. Die überwiegende Zahl der Forscher jedoch beschreibt das Zytoplasma als wässrige Suspension von intrazellulären Partikeln in einer Lösung von Makromolekülen.

Die chemische Zusammensetzung einer "Durchschnittszelle" geht aus der Tabelle 1 hervor [17]. Der Hauptbestandteil von 75 bis 85 Gewichtsprozent entfällt auf das Wasser und etwa 20 bis 15 Gewichtsprozent auf Proteine. Der Rest verteilt sich auf verschiedene Arten der Nukleinsäuren, auf Lipide, die im wesentlichen in der zytoplasmatischen Membran und in den intrazellulären Membranen lokalisiert sind und auf Intermediärprodukte des Stoffwechsels. Ein wichtiger Bestandteil des Zellinhaltes sind noch

Tabelle 1

Chemische Zusammensetzung einer "Durchschnittszelle".
Entnommen aus [17] .

SUBSTANCE	PER CENT	AVERAGE MOLECULAR WEIGHT	MOLARITY IN CELL	NUMBER OF MOLE- CULES RELATIVE TO PROTEIN
Water	85	18	47.2	1.7×10^4
Protein	10	36,000	0.0028	1
DNA†	0.4	10^6	0.000,004	—
RNA‡	0.7	4.0×10^4	0.000,175	—
Lipid	2	700	0.028	10^1
Other organic materials§	0.4	250	0.016	6
Inorganic	1.5	55	0.272	10^2

die Salzionen, wie z. B. Na^+ , Cl^- , K^+ , PO_4^{---} usw.
Sie haben zusammen mit den Proteinen eine entschei-
dende Bedeutung für die Aufrechterhaltung des intra-
zellulären Milieus.

Eine physikalisch-chemische Beschreibung des Zustan-
des einer Zelle setzt gewisse Kenntnisse über Art und
Größe der Wechselwirkungen der Komponenten untereinan-
der voraus. Grundsätzlich ist jede unterscheidbare
Molekülsorte im thermodynamischen Sinne als Komponen-
te zu bezeichnen. Wird jedoch eine allen Molekülen
gemeinsame Eigenschaft betrachtet, so können eine Rei-
he von Komponenten zu einer Komponente zusammengefaßt
werden. Zum Beispiel bei der Untersuchung der Wechsel-
wirkung zwischen dem Zellwasser und den Makromolekü-
len, können alle Zellproteine und auch Enzyme in erster
Näherung zu einer Komponente, der Proteinkomponente
zusammengefaßt werden. Eine weitere Vereinfachung ist
die Aufteilung der Zelle in eine wässrige und nicht-

wässrige Phase. Die nichtwässrige Phase wird von den Lipiden in seinen verschiedenen Formen, in den Membranstrukturen lokalisiert, gebildet. Die Hauptkomponente der wässrigen Phase ist das Zellwasser selbst. Aus der Tabelle 1 ist weiter zu entnehmen, daß die anorganischen Elektrolyte die höchste molare Konzentration in der wässrigen Phase haben. Beschränken wir uns weiterhin auf die wässrige Phase der Zelle, so ist zu erwarten, daß die Eigenschaften der Komponente Salz und der Komponente Wasser durch die Proteinkomponente mit ihrer großen Oberfläche und ihren zahlreichen polaren und nicht-polaren Gruppen erheblich beeinflußt werden.

Wasser, der Hauptbestandteil der biologischen Gewebe und Zellen, ist eine äußerst komplizierte Substanz mit einer großen Anzahl komplexer Erscheinungsformen. Wasser ist nicht allein Lösungsmittel oder Transportmedium für Nahrungsstoffe und Abbauprodukte sondern ist ebenso für die Struktur der Makromoleküle von entscheidender Bedeutung [28, 62]. Unsere Kenntnisse über die Struktur des Wassers sind jedoch noch sehr unvollkommen [4, 11, 10]. Und so ist es auch nicht verwunderlich, daß die Wechselwirkungen zwischen Wasser und anderen Komponenten durch theoretische Beschreibungen nur sehr schwer und ungenügend erfaßt werden können. Ergebnisse, die irgendwelche Aussagen über die Wechselwirkung zwischen Wassermolekülen und einer anderen Komponente machen, sind daher hinsichtlich ihrer Untersuchungsmethoden und ihrer im allgemeinen vereinfachenden Voraussetzungen zu beurteilen.

Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf kalorische Untersuchungen an wässrigen Gemischen von Proteinlösungen und biologischen Zellen. Die kalorische Methode

erlaubt Aussagen über die kalorischen Eigenschaften wie die spezifische Wärme oder die Schmelzwärme der Mischung. Unter bestimmten Voraussetzungen ist es dann möglich mit Hilfe der Thermodynamik Angaben über den Zustand der einzelnen Komponenten in der Mischung zu machen. Dem Experiment liegt der Gedanke zugrunde, daß diese kalorischen Eigenschaften des Wassers oder einer anderen Komponente im freien und im "gebundenen" Zustand verschieden sein sollten. Unter "gebundenem" Zustand ist jede Art von Wechselwirkung zwischen Wasser und einer anderen Komponente zu verstehen. Aus diesem unterschiedlichen Verhalten ist dann nach einer entsprechenden Modellvorstellung eine Aussage über den Zustand des Wassers oder einer anderen Komponente im Gemisch möglich.

In der Thermodynamik werden Gleichgewichtszustände durch einfache Gleichungen beschrieben. Von besonderem Interesse sind hierbei die Zustandsfunktionen, da ihre Größe vom Wege unabhängig ist, auf dem ein bestimmter Zustand erreicht wurde. Bei kalorischen Untersuchungen ist die interessierende Zustandsfunktion die Enthalpie H . Kleine Änderungen der Enthalpie H lassen sich durch folgende Gleichungen darstellen

$$dH = TdS + Vdp + \sum_{i=1}^n \mu_i dn_i. \quad (1)$$

Hierin bedeuten T die Temperatur, S die Entropie, V das Volumen, p den Druck, μ_i das chemische Potential der Komponente i und n_i die Zahl der Mole der Komponente i .

Ist das betrachtete System abgeschlossen und unter konstanten Druck, so vereinfacht sich diese Gleichung zu

$$dH = TdS. \quad (2)$$

Wird das System vom Zustand I in den Zustand II gebracht, so können dabei chemische Reaktionen ablaufen. Diese chemischen Reaktionen müssen jedoch schnell im Vergleich zur Temperaturerhöhung ablaufen, damit das System im thermodynamischen Gleichgewicht bleibt. Gleichung (2) kann schließlich auch in die folgende Form gebracht werden

$$dH = dQ. \quad (3)$$

Bei kalorischen Untersuchungen wird die Wärmemenge dQ im allgemeinen in Form von elektrischer Arbeit durch einen Heizdraht zugeführt. Diese elektrische Arbeit, die einer Messung unmittelbar zugänglich ist, wird in Wärme umgewandelt, die dem System zugeführt wird. Die Enthalpiedifferenz $\Delta H = H(\text{II}) - H(\text{I})$ ist daher gleich der Wärmemenge, die notwendig ist, um das System vom Zustand I in den Zustand II zu überführen. Durchläuft das System dabei einen Phasenübergang, z. B. einen Schmelzprozess vom festen in den flüssigen Zustand, so gewinnt diese Untersuchungsmethode eine erhöhte Nachweisempfindlichkeit. Phasenumwandlungen sind im allgemeinen von sehr großen Enthalpieänderungen begleitet, die experimentell mit hoher Genauigkeit nachgewiesen werden können.

Die Idee, eingefrorene wässrige Systeme aufzutauen, um aus der Enthalpiedifferenz des Systems Rückschlüsse auf das Verhalten der einzelnen Komponenten zu ziehen, hat bereits RUBNER 1922 in einer ausführlichen Abhandlung beschrieben [58]. Die Methodik hat zur Voraussetzung, daß das an Makromolekülen "gebundene" Wasser bei Abkühlung auf tiefe Temperaturen (etwa -20°C) nicht als Eis ausfriert, im Gegensatz zu dem freien Wasser. Das freie Wasser gefriert als Eis aus und kann kalorimetrisch bestimmt werden. Das Experiment bestand

dabei hierin, daß das bei einer Temperatur von -20°C eingefrorene Versuchsmaterial in ein Dewargefäß überführt und nach dem Auftauen die entsprechende Temperaturänderung gemessen wurde. Aus dem bekannten Wassergehalt des Materials konnte dann die Menge des nicht ausgefrorenen Wassers berechnet werden. RUBNER bezeichnete den Anteil des Wassers als "gebundenes" Wasser, der bei einer Temperatur von -20°C nicht ausfriert. In der folgenden Tabelle 2 sind einige Ergebnisse aufgeführt, die RUBNER nach seiner kalorischen Methode erhalten hat. Pro 1 Gramm Trockensubstanz ergaben sich folgende Mengen "gebundenen" Wassers

Tabelle 2	Eiweiß	0,33 g
	Blutkörperchen	0,63 g
	Blutgefäße	0,45 g
	Rindermuskel (tot)	0,76 g
	Froschmuskel (lebend)	0,90 g
	elastisches Gewebe	0,44 g

THOENES [66] hat diese kalorische Methode 1925 wieder aufgegriffen und weitere Untersuchungen am Muskel durchgeführt. Die Versuche wurden nach der Technik von RUBNER durchgeführt. THOENES fand im Muskelgewebe junger Tiere 2 Gramm "gebundenes" Wasser pro Gramm Trockensubstanz. Dieser Anteil des "gebundenen" Wassers nahm mit zunehmendem Alter der Tiere ab und erreichte einen Wert von 1 Gramm "gebundenem" Wasser pro 1 Gramm Trockensubstanz.

In den folgenden Jahren kombinierten zahlreiche Forscher [55, 27, 5, 29, 6] dieses kalorische Verfahren mit anderen physikalisch-chemischen Methoden. GORTNER und Mitarbeiter [18] nahmen an, daß das "gebundene" Wasser nicht als Lösungsraum für Saccharose zur Verfügung stehe. Durch die Bestimmung der Gefrierpunkterniedrigung in verschiedenen Lösungen nach Zugabe von Saccharose konnten der Anteil des "gebundenen" Wassers

berechnet werden. Sie konnten zeigen, daß ein beachtlicher Anteil des Wassers gebunden war aber in dem Sinne, daß dieses Wasser nicht als Lösungsvolumen für Saccharose zur Verfügung stand. Die kryoskopische Methode wurde von KISTLER [27] stark kritisiert, da die Möglichkeit einer Unterkühlung der Flüssigkeiten eine exakte Gefrierpunktsbestimmung sehr erschwert. Besonders bei kolloidalen Lösungen und biologischen Geweben liegen besonders begünstigt Bedingungen vor, unter denen kleine Flüssigkeitströpfchen nur unterkühlt werden und nicht ausfrieren.

Eine weitere Methode beruht darauf, daß eine lösliche Substanz, die ohne Widerstand durch die Zellwände treten kann, sich in der äußeren Lösung und im freien Wasser in der Zelle gleichmäßig verteilt. Eine quantitative Bestimmung der Konzentration in den beiden Lösungsräumen ermöglicht die Berechnung des freien Wassers in der Zelle.

GROLLMANN [19] und HILL [26] bestimmten aus Dampfdruckmessungen den Anteil des "gebundenen" Wassers. In einer Lösung werden verschiedene Substanzen gelöst und jeweils die Dampfdruckerniedrigung gemessen. Danach werden die Dampfdruckerniedrigungen einer Salzlösung bestimmt - nach Zugabe derselben löslichen Substanzen -, deren Wassergehalt gleich dem der zu untersuchenden Lösung ist. Aus dem Unterschied der Dampfdruckerniedrigungen kann dann der Anteil des "gebundenen" Wassers berechnet werden.

Eine andere Methode benutzt die unterschiedlichen Relaxationszeiten der Wassermoleküle im "gebundenen" und freien Zustand. Infolge der Wechselwirkungen zwischen Protein- und Wassermolekülen wird die Beweg-

lichkeit der Wassermoleküle erheblich eingeschränkt. Dieser Anteil des Wassers, der in seiner Beweglichkeit stark vermindert ist, wird als "gebundenes" Wasser bezeichnet. Ausführliche Untersuchungen über die Beweglichkeit der Wassermoleküle in makromolekularen Lösungen hat SCHWAN [61] mit Hilfe der dielektrischen Methode durchgeführt. ROSEN [56] konnte mit Hilfe der dielektrischen Methode nachweisen, daß das "gebundene" Wasser aus mindestens zwei Fraktionen besteht. ROSEN hat diese Untersuchungen an Protein-Wasser-Gemischen durchgeführt.

Jede dieser hier aufgeführten Bestimmungsmethoden des Anteils des "gebundenen" Wassers hat ihre eigene Definition des "gebundenen" Wassers. Diese Tatsache ist sehr zu beachten bei einem Vergleich der unterschiedlichen Werte des "gebundenen" Wassers.

2. Thermodynamische Eigenschaften von Mischungen

Die Untersuchung von Mischungen ist ein möglicher Weg, Aussagen über die gegenseitige Wechselwirkung der Komponenten in einer Mischung zu erhalten. Die Enthalpie H_m einer Mischung ist eine Zustandsfunktion. Sie ist eine extensive Größe und eine homogene Funktion ersten Grades in den Molzahlen n_i . Wird daher die Masse des Systems verdoppelt, so nimmt auch H_m um den doppelten Betrag zu. Aus dieser Eigenschaft und dem Eulerschen Satz für homogene Funktionen ersten Grades folgt [20]

$$H_m = \sum_{i=1}^k n_i \left(\frac{\partial H_m}{\partial n_i} \right)_{T, P, n_{i \neq j}} . \quad (4)$$

Die Enthalpie der Mischung H_m setzt sich additiv aus den Partialenthalpien $(\partial H_m / \partial n_i)_{T, P, n_{i \neq j}}$ der einzelnen Komponenten zusammen, die noch mit der entsprechenden Molzahl multipliziert werden müssen. Dabei ist der Druck p und die

Temperatur T konstant zu halten. Summiert wird über alle Komponenten i von $i=1$ bis $i=k$. Die Partialenthalpie ist eine intensive Größe, die nur vom Druck, von der Temperatur und der Zusammensetzung der Mischung abhängt. Die Partialenthalpie beantwortet die Frage, welcher Anteil der extensiven Größe H_m jeder einzelnen Komponente zugeschrieben werden kann. Bei der Untersuchung von Zellen werden mit k die Zahl der Komponenten in der Zelle bezeichnet, die physikalisch-chemisch unterscheidbar sind. Zum Beispiel verschiedene Proteine, Lipide, Kohlenhydrate, Metabolite, Elektrolyte und Wasser. Für eine Mischung aus k Komponenten gilt bei konstantem Druck und für ein konstantes Temperaturintervall, das während einer Messung durchfahren wird, folgende Beziehung

$$\Delta H_m = \sum_{i=1}^k n_i \left(\frac{\partial \Delta H_m}{\partial n_i} \right) \Delta T, p, n_{i \neq j} \quad (5)$$

Dabei ist es Voraussetzung, daß der Anfangszustand und der Endzustand thermodynamische Gleichgewichtszustände sind. Thermodynamische Gleichgewichtszustände sind dadurch ausgezeichnet, daß innerhalb des Systems keine Prozesse mehr ablaufen können, wenn das System von allen Einwirkungen der Umgebung abgeschlossen ist. Während der Zufuhr von Wärme in dem betrachteten Temperaturintervall können chemische Reaktionen ablaufen. Die Enthalpiedifferenz ΔH_m bleibt davon unbeeinflusst, da das System erst wieder im thermodynamischen Gleichgewicht ist, sobald die chemischen Reaktionen abgelaufen sind. Soll jedoch die Änderung von H_m mit der Temperatur $T - (\partial H_m / \partial T)_p$ - gleich der Wärmekapazität der Mischung sein, so müssen eventuell ablaufende chemische Reaktionen schnell verlaufen im Vergleich zur Temperaturerhöhung. Neben chemischen Reaktionen können auch Phasenübergänge auftreten, die einen erheblichen Anteil an der Enthalpiedifferenz ausmachen können. Der Verlauf der Enthalpie zeigt bei der Temperatur, bei der die

Phasenumwandlung erfolgt, eine Sprungstelle.

Die biologische Zelle enthält Wasser als Hauptkomponente, während die übrigen Anteile als Trockenanteil zusammengefaßt werden können. Die Trockenanteile enthalten alle löslichen und nicht löslichen Komponenten. Wird die Wasserkomponente mit $i=k$ bezeichnet, so gilt

$$\Delta H_m = \sum_{i=1}^{k-1} \left(\frac{\partial \Delta H_m}{\partial n_i} \right) n_i + \left(\frac{\partial \Delta H_m}{\partial n_k} \right) n_k. \quad (6)$$

Gelingt es im Experiment - z. B. im Falle einer biologischen Zelle - nur die Wasserkomponente zu variieren, während der Trockenanteil $n_t = \sum_{i=1}^{k-1} n_i$ konstant bleibt, so ist c_i der jeweilige Trockengewichtsanteil der entsprechenden Substanz.

$$c_i = \frac{n_i}{\sum_{i=1}^{k-1} n_i} = \frac{n_i}{n_t} \quad (7)$$

Gleichung (6) geht dann über in folgende Beziehung

$$\Delta H_m = \left\{ \sum_{i=1}^{k-1} c_i \left(\frac{\partial \Delta H_m}{\partial n_i} \right) \right\} n_t + \left(\frac{\partial \Delta H_m}{\partial n_k} \right) n_k \quad (8)$$

Diese Gleichung hat die für eine binäre Mischung charakteristische Form. Die beiden Variablen sind der Trockenanteil n_t und der Wasseranteil n_k der Zelle.

In einem Modellsystem einfachster Art für ein Zytoplasma wird z. B. der gesamte Trockenanteil nur durch ein einziges Protein dargestellt. Die Ergebnisse solcher Untersuchungen können dann ohne jede Näherung nach der Theorie binärer Mischungen analysiert werden und geben Aufschluß über den Zustand der einzelnen Komponenten im Gemisch.

Eine Erweiterung dieses einfachen Zytoplasmamodells besteht darin, daß das Zweikomponentensystem um eine dritte Komponente erweitert wird. Neben Wasser und Protein wird Salz als dritte Komponente eingeführt. Die Enthalpiedifferenz

dieses ternären Gemisches wird durch folgende Gleichung beschrieben

$$\Delta H_m = \sum_{i=1}^3 \left(\frac{\partial \Delta H_m}{\partial n_i} \right) n_i \quad (9)$$

Eine vollständige Analyse dieses Gemisches bedeutet einen sehr umfangreichen experimentellen Aufwand, da für alle möglichen Proteingemische noch zusätzlich die Salzanteile variiert werden müssen. Um einen Einblick in das Verhalten der Proteinkomponente in einem Salzgemisch zu bekommen, kann eine Auswahl aus der großen Vielfalt der Möglichkeiten der Mischungsverhältnisse getroffen werden. Wählt man z. B. als Lösungsmittel nicht Wasser sondern eine Salzlösung konstanter Konzentration, so reduziert sich die Gleichung (9) zu der Beziehung

$$\Delta H_m = \left(\frac{\partial \Delta H_m}{\partial n_1} \right) n_1 + \left\{ c_s \left(\frac{\partial \Delta H_m}{\partial n_s} \right) + c_w \left(\frac{\partial \Delta H_m}{\partial n_w} \right) \right\} n_2 \quad (10)$$

Hierin bedeutet $c_s = \frac{n_s}{n_s + n_w}$ den Anteil des Salzes und $c_w = \frac{n_w}{n_s + n_w}$ den Anteil des Wassers in dem Lösungsmittel. Die Summe der Molzahlen $n_w + n_s = n_1$ ist konstant. Dadurch ist aus der ursprünglich ternären Mischung eine pseudobinäre Mischung geworden, deren Variablen jetzt n_1 (Proteinkomponente) und n_1 (Lösungsmittelkomponente) sind.

Besteht ein ternäres Gemisch aus zwei flüssigen Komponenten und einer Salzkomponente, so vereinfacht sich eine Analyse dadurch, daß man bei konstantem Anteil der Salzkomponente die Anteile der flüssigen Komponenten variiert. Unter der Voraussetzung, daß $\frac{n_s}{n_s + n_{f_1} + n_{f_2}} = k$ ist, geht Gleichung (9) über in die Form

$$\Delta H_m = \left\{ \left(\frac{\partial \Delta H_m}{\partial n_{f_1}} \right) + \left(\frac{k}{k-1} \right) \left(\frac{\partial \Delta H_m}{\partial n_s} \right) \right\} n_{f_1} + \left\{ \left(\frac{\partial \Delta H_m}{\partial n_{f_2}} \right) + \left(\frac{k}{k-1} \right) \left(\frac{\partial \Delta H_m}{\partial n_s} \right) \right\} n_{f_2} \quad (11)$$

Hierin sind die Variablen die Molzahlen n_{f_1} und n_{f_2} der beiden Flüssigkeiten. In den geschweiften Klammern stehen je-

weils die Partialenthalpien der Flüssigkeiten und ein Beitrag der Salzkomponente, der mit abnehmenden Wert von k gegenüber dem Beitrag der Flüssigkeitskomponente vernachlässigt werden kann.

Zur Bestimmung der Partialgrößen, also den Größen, die das Verhalten der einzelnen Komponenten in der Mischung widerspiegeln, wird die Gleichung (5) etwas umgeschrieben. Dazu wird die Gleichung (5) durch die Summe aller Molzahlen $\sum_{i=1}^k n_i$ dividiert

$$\frac{\Delta H_m}{\sum_{i=1}^k n_i} = \frac{\sum_{i=1}^k \left(\frac{\partial \Delta H_m}{\partial n_i} \right) n_i}{\sum_{i=1}^k n_i} \quad (12)$$

$\Delta H_m / \sum_{i=1}^k n_i$ ist die mittlere Enthalpiedifferenz der Mischung und wird mit ΔH bezeichnet. Nach Einführung der Molenbrüche $x_i = \frac{n_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$ und den Partialgrößen $\Delta H_i = \partial \Delta H / \partial x_i$ nimmt Gleichung (12) im Falle einer binären Mischung folgende einfache Form an

$$\Delta H = x_1 \Delta H_1 + x_2 \Delta H_2 \quad (13)$$

Um nun eine Aussage über die Partialgrößen zu erhalten, wird Gleichung (13) nach dem Molenbruch x_1 differenziert und es ergibt sich daraus für die Partialgrößen folgender Zusammenhang

$$\Delta H_1 = \Delta H - x_1 \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial x_1} \right) \quad (14)$$

$$\Delta H_2 = \Delta H + (1-x_1) \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial x_1} \right) \quad (15)$$

Im Versuch wird die mittlere Enthalpiedifferenz ΔH in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Gemisches ermittelt. Die Gleichungen (14) und (15) geben eine Vorschrift an, wie daraus die Partialgrößen zu gewinnen sind. Im allgemeinen

wird die mittlere Enthalpiedifferenz der Mischung einen mehr oder weniger komplizierten Verlauf aufweisen. Eine Bestimmung der Steigung, so wie es in Gleichung (14) und (15) erforderlich ist, wird daher nur in sehr einfachen Fällen ohne große Fehler möglich sein. Zum Beispiel wenn ΔH linear von der Zusammensetzung des Gemisches abhängt. Ist eine Bestimmung der Steigung nicht mit genügender Genauigkeit möglich, so ersetzt man das Tangentenverfahren durch eine Sekantenkonstruktion [57]. Die so ermittelte Größe wird dann als scheinbare Partialgröße bezeichnet. Diese Größe läßt sich aus dem experimentell ermittelten Verlauf von ΔH genauer ermitteln. Die Bestimmungsmethoden der Partialgrößen, wie sie hier an einem binären Gemisch erläutert wurden, können auch auf Mischungen mit mehreren Komponenten angewendet werden.

Im einfachsten Fall treten zwischen den Komponenten keine Wechselwirkungskräfte auf. Bei der Herstellung solcher Mischungen ist die Mischungsenthalpie gleich Null. Die Enthalpiedifferenz setzt sich entsprechend dem Anteil der einzelnen Komponenten additiv zusammen. Solche Mischungen werden athermisch genannt. Im allgemeinen werden jedoch die Komponenten miteinander in Wechselwirkung treten. Abweichungen von der Additivität weisen auf solche Wechselwirkungen der Komponenten hin.

Untersuchungen der kalorischen Eigenschaften des Wassers in Modellösungen

3.10 Meßverfahren und Eichung des Kalorimeters

Zur Bestimmung der mittleren Enthalpiedifferenz der Mischung wurde ein Differential-Scanning-Calorimeter (DSC-1B) der Firma Perkin Elmer benutzt. Bei diesem isothermen oder temperaturkontrollierten Kalorimeter-

typ wird die Probe nach einem vorgegebenen Temperaturprogramm erwärmt. Die Temperatur ist also die unabhängige Variable, während die Enthalpie die abhängige, zu bestimmende Variable ist. Dieses Messverfahren hat den Vorzug, daß eine direkte Bestimmung der Wärmemenge möglich ist, die notwendig ist, um die Probe von einem Ausgangszustand mit der Temperatur T_a in einen Endzustand zu bringen, dessen Temperatur T_e ist.

Die Untersuchungen wurden in dem Temperaturbereich von etwa -50°C bis einige Grade über Null durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das Kalorimeter in seinem Aufbau entsprechend modifiziert, um Messungen in diesem Temperaturbereich durchführen zu können. Der oben erwähnte Temperaturbereich wurde deswegen gewählt, da in diesem Bereich alle Phasenübergänge der in dieser Arbeit untersuchten wässrigen Lösungen liegen. Das Meßverfahren beruht im wesentlichen auf dem Nachweis dieser Phasenübergänge vom festen in den flüssigen Zustand. Phasenumwandlungen dieser Art laufen bei konstanter Temperatur ab - soweit reine Substanzen vorliegen - unter Aufnahme erheblicher Wärmemengen. Diese großen Wärmemengen lassen sich auch bei sehr kleinen Probenmassen noch mit genügender Genauigkeit nachweisen.

Die Bestimmung der Probenmassen erfolgte mit einer Elektro-Cahn-Waage. Die Massen betrugen im allgemeinen 1 mg bis 5 mg. Jede Probe wurde in eine Aluminiumkapsel gasdicht eingeschlossen. Die Massen dieser Aluminiumkapseln betrugen im Mittel 24,8 mg und unterschieden sich nicht um mehr als 1 % voneinander. Sie konnten daher bei allen Messungen als ein konstanter Leerwert abgezogen werden.

Zu Beginn einer jeden Messung muß sich innerhalb der

Probe selbst und zwischen Probe und Probenhalterung ein thermodynamisches Gleichgewicht einstellen. Das ist der Ausgangszustand des Systems. Dieser Zustand ist dann erreicht, wenn in diesem isothermen Zustand des Systems der an das Kalorimeter angeschlossene Schreiber eine Linie mit der Steigung Null aufzeichnet. Wird die Heizung eingeschaltet, so wird im DSC-1B zwei identischen Systemen Wärme zugeführt. Da aber ein System die Probe enthält, muß diesem System mehr Wärme zugeführt werden, damit bei einer vorgegebenen Temperaturerhöhung pro Zeit die Temperaturdifferenz zwischen beiden Systemen immer gleich Null ist. Dieser erhöhte Wärmebedarf des einen Systems wird vom Schreiber registriert, indem er von seiner Grundlinie abweicht (siehe Abb. 1). Tritt in dem untersuchten Temperaturbereich ein Phasenübergang auf, so wird dafür ein erheblicher Wärmebedarf benötigt. Die Schreiberanzeige registriert diesen Vorgang durch einen steilen Anstieg, um nach dem Phasenübergang wieder näher an die Grundlinie zurückzukehren. Die Probe befindet sich in einem anderen Zustand. Wird die Temperatur noch weiter erhöht, so muß der Probe weiter Wärme zugeführt werden. Erst nach dem Abschalten der Heizung, wenn das System auf einer konstanten Temperatur gehalten wird, erreicht der Schreiber seine Ausgangslinie wieder. Die Probe befindet sich dann im thermodynamischen Gleichgewicht bei der entsprechenden Temperatur.

In Abb. 1 ist am Beispiel des Eises der oben beschriebene Vorgang dargestellt. Eine Probe von etwa 1 mg Eis wurde von einer Temperatur von -50°C auf etwa $+10^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Der Beitrag der gesamten Wärmekapazität (Aluminiumkapsel und Eis) ist an der Verschiebung der Grundlinie zu erkennen. Diese Verschiebung der Grundlinie rührt aber im wesentlichen von der Aluminiumkapsel

her. Nur der schwarz gekennzeichnete Anteil der Fläche unterhalb der Kurve ist dem Eis zuzuordnen. Bei einer Temperatur von 0°C schmilzt das Eis und der endotherme

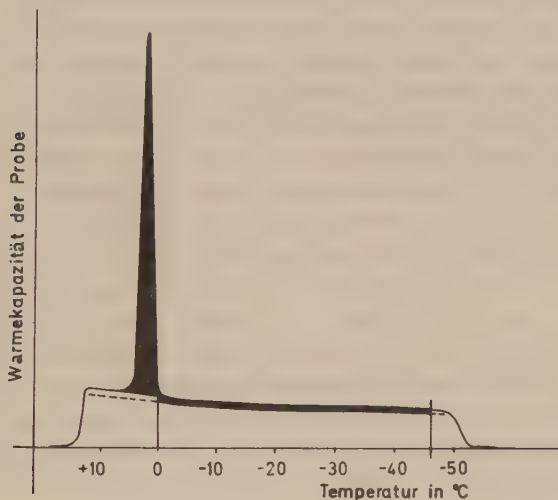


Abb. 1: Schmelzkurve von Eis. Auf der Abszisse ist die Temperatur und auf der Ordinate die Wärmekapazität der Probe aufgetragen. Die Probe besteht aus einer Aluminiumkapsel, die Eis enthält.

Phasenübergang erfordert eine erhebliche Wärmemenge. Die Enthalpiedifferenz ergibt sich durch Integration über den Temperaturbereich von -47°C bis 0°C . Dazu kommt noch die Schmelzenthalpie des Eises. Beides zusammen ergibt also die Enthalpiedifferenz, um 1 mg Eis von einer Temperatur von -47°C auf 0°C zu erwärmen. Die schwarz gekennzeichnete Fläche in Abb. 1 zeigt, daß etwa 79 % der zugeführten Wärmemenge auf den Schmelz-

prozess entfallen. Nur 21 % der zugeführten Wärmemenge wird zur Erwärmung des Eises von einer Temperatur von -47°C auf 0°C verbraucht. Die gestrichelte Linie in Abb. 1 gibt den Beitrag der leeren Aluminiumkapsel an.

Zur Eichung des DSC-1B wurde Wasser verwendet. Die zur Berechnung der Enthalpiedifferenz notwendigen Werte für die spezifische Wärme c_p wurden einer Veröffentlichung von GIAUQUE [16] entnommen. Mit Hilfe dieser Werte ergibt sich für die Enthalpiedifferenz im Temperaturbereich von -47°C bis 0°C ein Wert von $101,5 \text{ cal/g} = 424,67 \text{ Joule/g}$. Dieser Wert enthält sowohl die Wärmemenge zur Erwärmung des Eises von einer Temperatur von -47°C auf 0°C als auch die Schmelzwärme des Eises. Im Experiment wurde die schwarz gekennzeichnete Fläche in Abb. 1 mit einem Planimeter ausgemessen und dem oben angegebenen Wert für ΔH zugeordnet. Damit ist das Kalorimeter geeicht und kann zu weiteren Untersuchungen verwendet werden.

3.20 Herstellung der Mischungen

3.21 Wasser-Protein-Gemische

Die Proben bestanden aus Rinderserumalbumin (RSA)-Wasser-Gemischen. Wässrige Lösungen wurden hergestellt, indem "Serum-Albumin vom Rind, trocken, reinst" - wie es die Behring-Werke vertreiben - abgewogen und in Wasser aufgelöst wurde. So konnten Gemische hergestellt werden, deren Anteil an RSA bis zu 50 % betrug. Solche Gemische waren schon sehr zähflüssig und schwierig zu durchmischen. Damit die Verteilung des Wassers in den RSA-Wasser-Gemischen mit dem Hauptbestandteil RSA homogen war, wurden dünne Schichten des trockenen

RSA über H_2SO_4 unterschiedlicher Konzentration etwa 30 Stunden lang in Exsikkatoren aufbewahrt. Nach dieser Zeit nahm das RSA keine Feuchtigkeit mehr auf [25, 22]. Der genaue Wassergehalt der Proben wurde durch eine Trockengewichtsbestimmung ermittelt. Dabei wurden die Proben etwa 24 Stunden lang auf 108°C erhitzt und danach gewogen. Die Bestimmung der Probenmassen erfolgte mit einer Elektro-Cahn-Waage. Diese Waage hat eine Empfindlichkeit von 0,1 mg und eine Ablesegenauigkeit von 0,01 % vom Vollausschlag. Die Probenmassen betrugen einige Milligramm.

3.22 Wasser-Protein-Salz-Gemische

Zunächst wurde eine 8 % bis 10 % wässrige RSA-Lösung hergestellt und entionisiert. Die Entionisierung erfolgte mit einer Mischbett-Ionenaustauscher-Säule (Merck V oder Serdolit M-B) bei 4°C [51]. Um RSA-Lösungen höherer Konzentration zu erhalten, wurde die entionisierte RSA-Lösung gefriergetrocknet. Das so vorbehandelte RSA war die Ausgangssubstanz zur Herstellung der Gemische. Die Anteile der Komponenten im Gemisch wurden eingewogen. Durch Zugabe von Natronlauge bzw. Salzsäure konnte der pH-Wert des Gemisches in weiten Grenzen geändert werden. Die zur Einstellung eines bestimmten pH-Wertes erforderliche Menge Lauge bzw. Säure war in sehr guter Näherung stöchiometrisch durch den Proteingehalt der Mischung gegeben. Die Messung des pH-Wertes wurde mit einem pH-Meter der Firma Radiometer (Kopenhagen) durchgeführt. Der Zusatz an Lauge bzw. Säure ändert nicht nur den pH-Wert der Lösung, sondern hat einen entscheidenden Einfluß auf die

mittlere Ladung des Proteinmoleküls. Wie stark die mittlere Ladung des RSA in einer Salzlösung vom pH-Wert des Gemisches abhängt, zeigt Abb. 2.

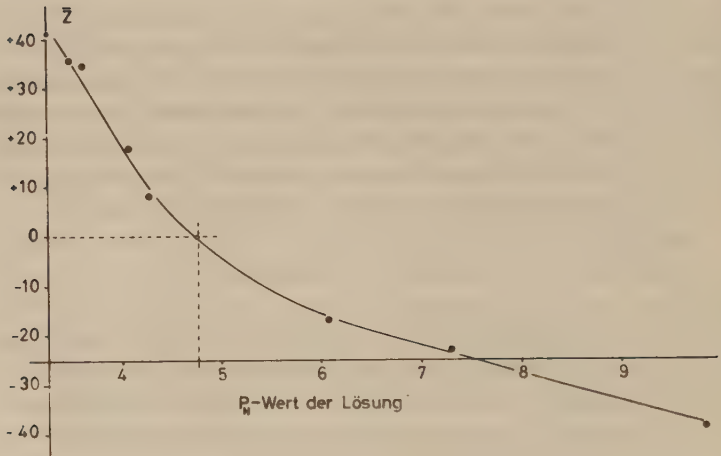


Abb. 2: Mittlere Ladung $\bar{z}$ des RSA-Moleküls in einer Salzlösung in Abhängigkeit von dem pH-Wert der Mischung. (Entnommen aus [51]).

Bei einem pH-Wert von etwa 4,8 ist die mittlere Ladung $\bar{z}$ des RSA-Moleküls Null. Das bedeutet, daß das RSA-Molekül gleich viele positive und negative Ladungen trägt. Bei anderen pH-Werten der Mischung nimmt die mittlere Ladung $\bar{z}$ Werte von +30 bis etwa -35 an. Der RSA-Konzentrationsbereich lag zwischen 3 % und 26 % Gewichtsanteilen.

3.30 Ergebnisse der Untersuchungen an Modellösungen

3.31 Kalorische Eigenschaften einer Protein-Wasser-Mischung

Als einfachste Modellösung für ein Zytoplasma wurde ein Protein-Wasser-Gemisch gewählt. Die Proteinkomponente war "Serum-Albumin vom Rind, trocken, reinst". Das RSA wurde abgewogen und in Wasser aufgelöst. Proben mit unterschiedlichem Wassergehalt wurden eingefroren und die Enthalpiedifferenz der Mischung - nach dem oben beschriebenen Verfahren - im Temperaturbereich von -47°C bis 0°C gemessen.

Bei den kalorischen Untersuchungen von Gemischen verändert sich die Schmelzkurve in einer sehr auffallenden Weise im Vergleich zu der Schmelzkurve einer reinen Substanz. Reine Substanzen haben eine feste, der Substanz charakteristische Schmelztemperatur sowie Schmelzenthalpie. Der Schmelzprozess von Eis ist in Abb. 1 dargestellt. Der Phasenübergang ist durch einen ausgeprägten Peak ausgezeichnet. Der Schmelzvorgang einer Mischung ist dagegen ein wesentlich komplizierterer Prozeß. In Abb. 3 ist die Schmelzkurve eines Protein-Wasser-Gemisches dargestellt.

Die schraffierte Fläche entspricht der mittleren Enthalpiedifferenz. Die in Abb. 3 dargestellte Schmelzkurve zeigt, daß unter diesen experimentellen Bedingungen nur die Bestimmung der mittleren Enthalpiedifferenz eine sinnvolle und exakte Größe ist. Der Prozeß der Phasenumwandlung erstreckt sich über einen sehr weiten Temperatur-

bereich und beginnt bereits bei relativ tiefen Temperaturen. Eine Abtrennung der Schmelzenthalpie von dem gesamten übrigen Prozeß ist nur schwer - wenn überhaupt - möglich.

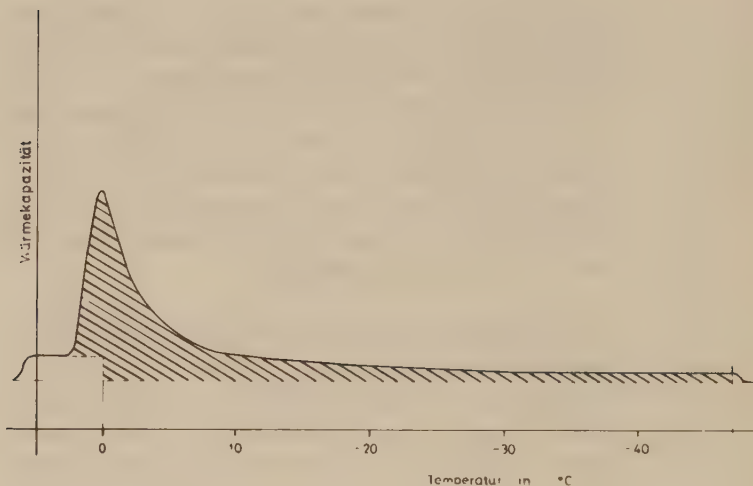


Abb. 3: Schmelzkurve eines RSA-Wasser-Gemisches. Auf der Ordinate ist die Wärmekapazität, auf der Abszisse die Temperatur der Probe aufgetragen.

Um den kalorischen Beitrag der Aluminiumkapsel von dem des Gemisches abzutrennen, wurden Proben gleicher Zusammensetzung - jedoch mit unterschiedlicher Masse - im Temperaturbereich von bis -47°C bis 0°C im Kalorimeter ausgemessen. Die Fläche unterhalb der Schmelzkurve, d. h. die mittlere Enthalpiedifferenz wurde mit einem Planimeter bestimmt. Trägt man die mittlere Enthalpiedifferenz ΔH der Proben in Abhängigkeit von der Probenmasse auf, so ergibt sich der

in Abb. 4 dargestellte Zusammenhang.

Der Schnittpunkt der Geraden in Abb. 4 ergibt den Mittelwert der Enthalpiedifferenz der Aluminiumkapseln, in die die Gemische eingewogen wurden. Die Steigung der Geraden ergibt unmittelbar den Mittelwert für die mittlere Enthalpiedifferenz der Gemische, deren Zusammensetzung konstant ist.

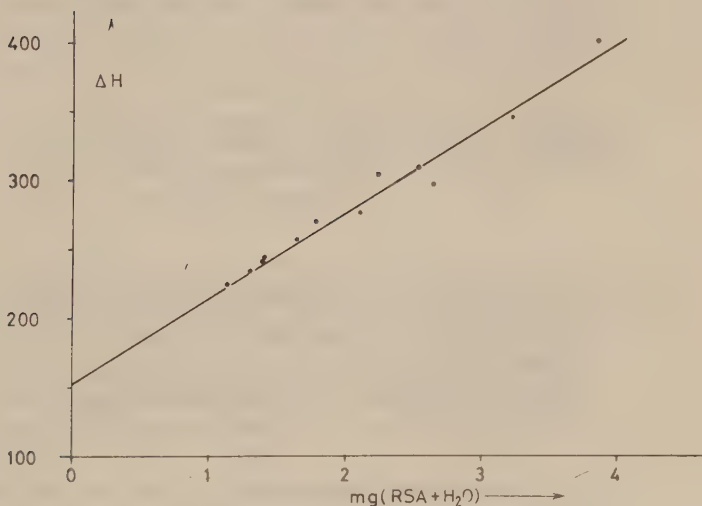


Abb. 4: Enthalpiedifferenz ΔH in willkürlichen Einheiten in Abhängigkeit von der Probenmasse. Der Wassergehalt dieses Wasser-Protein-Gemisches beträgt 0,65.

Variiert man die Zusammensetzung der Gemische, so ergeben sich verschiedene Formen der Schmelzkurven. Abb. 5 zeigt einen Überblick über das Ver-

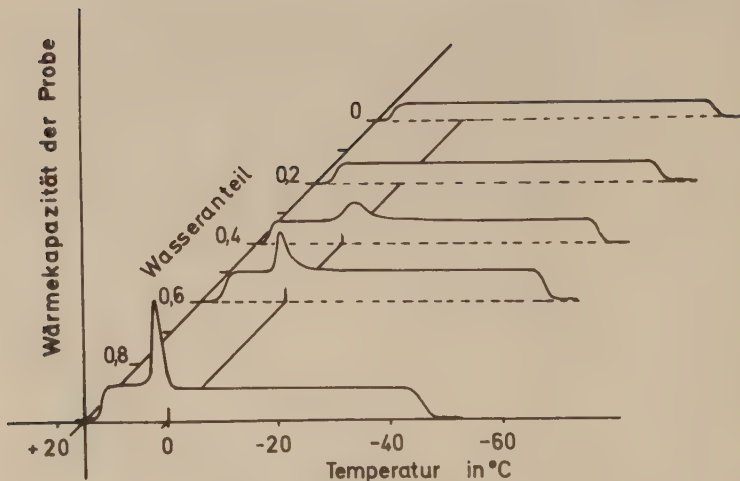


Abb. 5: Schmelzkurven von RSA-Wasser-Gemischen unterschiedlicher Zusammensetzung. Wasseranteil Null bedeutet reines trockenes RSA und Wasseranteil 1 entspricht reinem Wasser. Auf der Ordinate ist die Wärmekapazität auf der Abszisse die Temperatur der Proben aufgetragen. Auf der dritten Koordinate ist der Wasseranteil aufgezeichnet.

halten der Schmelzkurven unterschiedlicher Zusammensetzungen von RSA-Wasser-Gemischen. Trockenes RSA zeigt im betrachteten Temperaturbereich von -47°C bis 0°C einen flachen Verlauf der Schmelzkurve. Die Wärmekapazität ist relativ klein, so daß die Schmelzkurve eine kleine Amplitude aufweist. RSA mit einem Wasseranteil von 0,2 unterscheidet sich in seinem kalorischen Verhalten nur dadurch, daß die Amplitude gegenüber dem trockenen Protein nur geringfügig

zugenommen hat. Trotz des Wasseranteils von 0,2 zeigt auch diese Kurve im gesamten Temperaturbereich einen flachen Verlauf. Im besonderen ist kein Schmelzvorgang zu beobachten. Erst wenn der Wasseranteil den Wert von 0,3 überschreitet, beginnt sich auf der flachen Kurve ein breites Maximum aufzubauen. Der Schmelzvorgang setzt weit unterhalb von 0°C ein und erstreckt sich über einen ausgedehnten Temperaturbereich. Mit zunehmenden Wassergehalt wird der Schmelzvorgang immer ausgeprägter. Das Maximum der Enthalpiezunahme nähert sich immer mehr dem Schmelzpunkt des Eises.

Zur Bestimmung der mittleren Enthalpiedifferenz ΔH müssen die Flächen unter jeder Schmelzkurve in Abb. 5 bestimmt werden.

Durch ein Mittelungsverfahren, wie es in Abb. 4 beschrieben wurde, konnten Werte für ΔH erhalten werden, deren statistischer Fehler bei etwa 7 % lag. Trägt man diese Werte für ΔH in Abhängigkeit vom Wasseranteil $w = g(\text{H}_2\text{O})/g(\text{RSA} + \text{H}_2\text{O})$ auf, so ergibt sich die in Abb. 6 dargestellte Kurve.

Aus Abb. 5 ist zu erkennen, daß bei wasserarmen Gemischen, deren Wasseranteil w einen Wert von etwa 0,3 nicht überschreiten, kein Schmelzprozeß auftritt. Daraus ergeben sich Werte für die mittlere Enthalpiedifferenz der Mischung, die sich mit zunehmendem Wasseranteil nur wenig ändern. Diese Tatsache wird durch den flachen Anfangsteil der Kurve in Abb. 6 widergegeben. Erst wenn der Wasseranteil w einen Wert von etwa

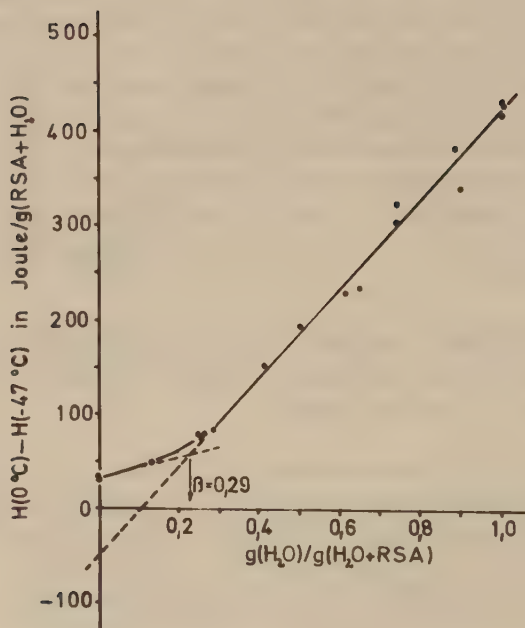


Abb. 6: Zunahme der mittleren Enthalpiedifferenz einschließlich der Schmelzenthalpie von RSA-Wasser-Gemischen zwischen -47°C und 0°C in Joule/g Mischung in Abhängigkeit vom Gewichtsanteil Wasser in der Mischung $w = g(\text{H}_2\text{O})/g(\text{RSA+H}_2\text{O})$.

β ist das pro Gramm trockenes RSA gebundene Wasser in Gramm.

0,3 überschreitet, tritt die Phasenumwandlung von Eis in Wasser auf. Mit zunehmendem Wassergehalt der Mischung erhöht sich der Beitrag der Schmelzenthalpie des Eises, bis schließlich eine lineare Abhängigkeit von der zugeführten Wassermenge vorliegt.

Von besonderem Interesse ist das RSA-Wasser-Gemisch, bei dessen Zusammensetzung der Phasenübergang Eis-Wasser gerade noch nicht auftritt bzw. gerade nicht mehr auftritt. Dieser Wasseranteil wird in dieser Arbeit als "kalorisch gebundenes" Wasser bezeichnet. Eine erste Näherung dieses Wasseranteils ist aus Abb. 5 zu ersehen. Man wählt unter den Schmelzkurven diejenige aus, bei der ein Schmelzpeak zum ersten Mal zu bemerken ist. Der entsprechende Wasseranteil ist $w = 0,29$ und ist in Abb. 6 durch die dichte Folge von vier Meßpunkten gekennzeichnet.

Durch den Schnittpunkt der strichlierten Geraden mit der Anfangssteigung der durchgezogenen Kurve (siehe Abb. 6) im Punkte $w = 0$ und dem linear ansteigenden Teil der Kurve - im Bereich wässriger RSA-Mischungen - kann ein Anteil "kalorisch gebundenes" Wasser definiert werden. Der Schnittpunkt der beiden strichlierten Geraden liegt bei $w = 0,23$. Umgerechnet auf Wasser pro Gramm trockenes RSA ergibt sich daraus ein Wert von 0,29 g. Dieser Wert wird mit β bezeichnet. Hierbei ist $\beta = w/(1-w)$ die auf das trockene Protein bezogene Menge des "kalorisch gebundenen" Wassers. Durch die Meßpunkte für Proben mit einem Wasseranteil oberhalb von 0,4 wurde nach der Methode der kleinsten Quadrate eine Gerade gelegt.

3.32 Analyse einer Protein-Wasser-Mischung mit Hilfe der Theorie binärer Mischungen

Eine eingehende Analyse der Meßergebnisse gelingt erst mit Hilfe der Theorie binärer Mischungen. Wie in dem Abschnitt 'thermodynamische Eigenschaften von Mischungen' dargelegt wurde, ist die Bestimmung der Partialenthalpien der Komponenten Wasser und RSA in der Mischung durch eine einfache Tangentenkonstruktion entsprechend den Gleichungen (14) und (15) möglich. Die Bestimmung der Partialgrößen ist in dem hier vorliegenden Fall besonders einfach, da sich der Verlauf der mittleren Enthalpiedifferenz der Mischung durch zwei Geraden annähernd beschreiben läßt. So ergibt die Extrapolation des linearen Teils der Kurve in Abb. 6 für $w = 0$ einen Schnittpunkt mit der Ordinate. Wie aus Gleichung (14) zu entnehmen ist, entspricht der auf der Ordinate abgelesene Wert der Partialenthalpie des RSA in einer wässrigen Lösung. Der Schnittpunkt derselben Geraden mit einer Parallelen zur Ordinate durch den Abszissenwert $w = 1$ ergibt den Wert für die Partialenthalpie des Wassers in einem wässrigen RSA-Wasser-Gemisch. In Abb. 7 sind die Partialenthalpien des Wassers $\partial \Delta H / \partial g (H_2O)$ und des RSA $\partial \Delta H / \partial g (RSA)$ in Abhängigkeit von dem Wassergehalt der Mischung dargestellt.

Der Verlauf der Funktionen ist nach dem oben beschriebenen Verfahren - entsprechend Gleichung (14) und (15) - berechnet worden. Bei $w = 0,35$ erreicht die Partialenthalpie des Wassers in der Mischung den Wert für das freie Wasser. Nimmt der Wasseranteil w noch weiter zu, so verhält

sich das zusätzliche Wasser wie freies Wasser, während der Wasseranteil für $w < 0,35$ unter dem Einfluß der Wechselwirkungskräfte zwischen RSA- und Wassermolekülen steht. Die Wassermenge, die unter dem Einfluß der Wechselwirkungskräfte steht, beträgt etwa $\beta = 0,54$ (siehe Abb. 7). Unter Verwendung der Funktion $f(w) = \partial \Delta H / \partial g(\text{H}_2\text{O})$ läßt sich die Menge des unter dem Einfluß der Wechselwirkungskräfte stehenden Wassers in zwei Bereiche unterteilen.

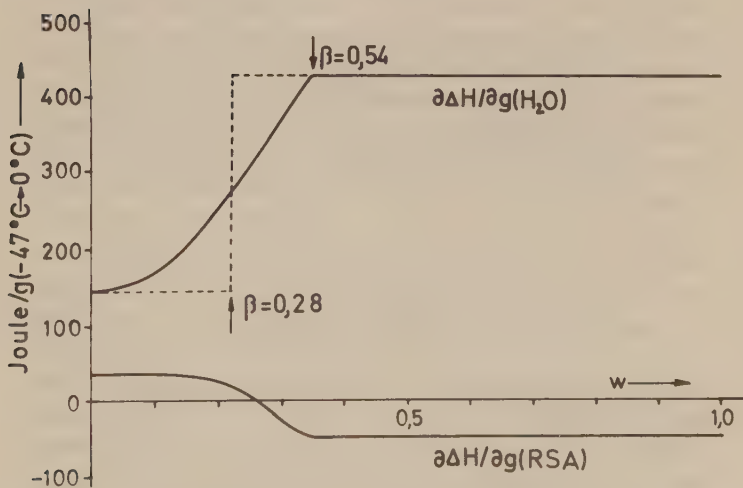


Abb. 7: Partialenthalpie des Wassers $\partial \Delta H / \partial g(\text{H}_2\text{O})$ und des RSA $\partial \Delta H / \partial g(\text{RSA})$ in einem RSA-Wasser-Gemisch, dessen Zusammensetzung auf der Abszisse angegeben ist. Der Ordinatenwert ist in Joule pro Gramm der Komponenten Wasser bzw. RSA angegeben. (Weitere Ausführungen im Text).

Im ersten Bereich hat die Partialenthalpie den Wert des freien Wassers und im zweiten Bereich besitzt das "kalorisch gebundene" Wasser die Partialenthalpie für $w \rightarrow 0$. Diese Unterteilung ist in Abb. 7 durchgeführt, indem die Funktion $f(w)$ durch eine flächengleiche Stufenfunktion ersetzt wurde. Der so bestimmte "Integralmittelwert" für β beträgt 0,28 g Wasser pro Gramm RSA.

Die Partialenthalpie des RSA in der Mischung $\partial \Delta H / \partial g(\text{RSA})$ ändert seinen Wert bei hochkonzentrierten Mischungen nur sehr wenig und entspricht etwa dem Wert des reinen RSA. Nach Durchlaufen eines Übergangsbereiches, in dem praktisch alle neu hinzukommenden Wassermoleküle in den Wirkungsbereich der Kräfte der RSA-Moleküle kommen, erreicht die Partialenthalpie des RSA einen negativen, konstanten Wert.

Modellvorstellungen, die dieses Verhalten des RSA in wässriger Lösung erklären können, werden im Rahmen der Diskussion erläutert.

3.33 Kalorische Eigenschaften einer Protein-Wasser-Salz-Mischung

Das Zytoplasma einer Zelle wurde im vorhergehenden Abschnitt in erster Näherung durch eine Modelllösung ersetzt, die aus einer Protein-Wasser-Mischung bestand. Der nächste Schritt, das Modellsystem einem Zytoplasma mehr anzugleichen, besteht darin, daß neben der makromolekularen Komponente RSA und der Komponente Wasser noch eine Salzkomponente hinzukommt. Dieser Zusatz der Salzkomponente - in dem hier vorliegenden

Fall NaCl - erweitert das binäre Gemisch zu einem ternären, dessen Behandlung ungleich schwieriger ist [21] . Wie in dem Abschnitt 'thermodynamische Eigenschaften von Mischungen' gezeigt wurde, gelingt eine Analyse eines ternären Gemisches nach Gleichung (10), wenn als Lösungsmittel nicht Wasser sondern eine Salzlösung bestimmter Konzentration verwendet wird. Diese Vereinfachung schränkt zwar die Information etwas ein, läßt aber bestimmte Aussagen über die gegenseitigen Wechselwirkungen der Komponenten im Gemisch zu.

Die kalorischen Eigenschaften einer Salzlösung unterscheiden sich sehr von denen des reinen Wassers (siehe Abb. 1) und einem Protein-Wasser-Gemisch (siehe Abb. 3). In Abb. 8 ist der Verlauf der Schmelzkurve einer 0,5 molalen NaCl-Lösung widergegeben.

Das Schmelzverhalten einer Salzlösung im Temperaturbereich von wenigen Graden unterhalb von Null ist mit dem Schmelzverhalten der Protein-Wasser-Mischung (siehe Abb. 3) vergleichbar. Je nach Konzentration der Lösung wird sich dieser Schmelzvorgang über einen unterschiedlichen Temperaturbereich ausdehnen. Daneben tritt aber bei Salzlösungen noch ein weiterer typischer Phasenübergang auf. Dieser Phasenübergang ist in Abb. 8 als ein ausgeprägtes und engbegrenztes Maximum zu erkennen. Die Zusammensetzung des Salz-Wasser-Gemisches, bei der dieser Phasenübergang auftritt, wird eutektisches Gemisch genannt. Das Eutektikum ist für jede Salzlösung eine charakteristische Größe. Die Schmelztemperatur des Eutektikums bei

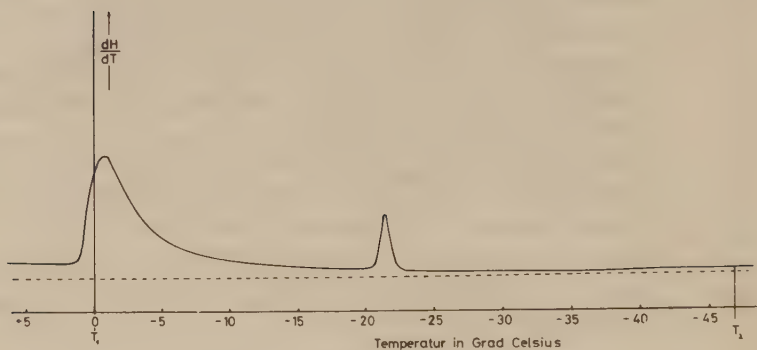


Abb. 8: Schmelzkurve einer 0,5 m NaCl-Lösung. Auf der Abszisse ist die Temperatur in Grad Celsius und auf der Ordinate die Wärmekapazität der Probe aufgetragen. Die Temperatur des Eutektikums liegt bei etwa -21°C . Die gestrichelte Linie ist die Grundlinie.

NaCl liegt bei einer Temperatur von etwa -21°C [22].

Zur Bestimmung der mittleren Enthalpiedifferenz der Mischung, die aus den drei Komponenten Wasser, Protein und Salz besteht, wurden Proben unterschiedlicher Zusammensetzung in Aluminiumkapseln eingewogen und im DSC-1B ausgemessen (siehe Seite 16). Einen Überblick über den Verlauf der Schmelzkurven solcher ternären Gemische zeigt die Abb. 9. Beträgt der Proteinanteil in der Mischung den Wert Null, so liegt das reine Lösungsmittel (0,5 m NaCl-Lösung) vor. Es sind die beiden Phasenumwandlungen zu erkennen, besonders der scharfe, eng begrenzte Phasenübergang des Eutektikums bei einer Temperatur von etwa -21°C .

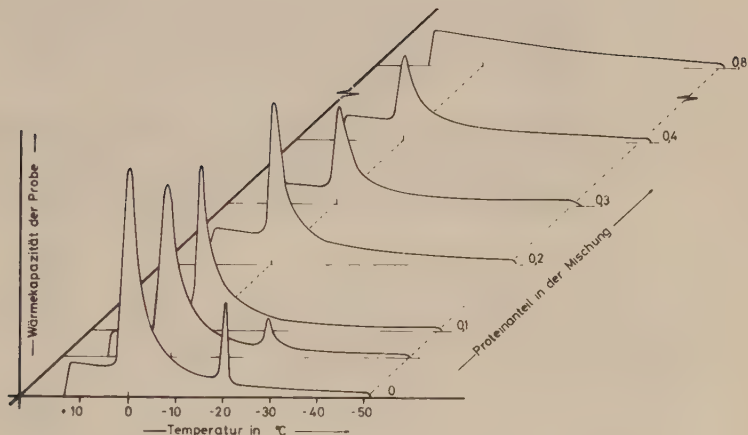


Abb. 9: Schmelzkurven von RSA-NaCl-Wasser-Gemischen unterschiedlicher Zusammensetzungen. Proteinanteil Null bedeutet reines Lösungsmittel (0,5 m NaCl-Lösung). Auf der Ordinate ist die Wärmekapazität auf der Abszisse die Temperatur der Proben aufgetragen. Die dritte Koordinate gibt den Proteinanteil im Gemisch an.

Daran anschließend folgt der ausgedehnte Schmelzvorgang der wässrigen NaCl-Lösung. Mit zunehmender Konzentration des RSA in der Salzlösung verändert sich der Verlauf der Schmelzkurven. Zunächst verschwindet das Maximum, das dem Eutektikum des NaCl zugeordnet werden kann. Diese Abnahme der Schmelzenthalpie des Eutektikums führt anfänglich zu einer Verbreiterung des Temperaturbereichs unterhalb von einer Temperatur von -21°C (siehe Abb. 9). Parallel dazu ist eine Abnahme der Amplitude zu bemerken. Erreicht der Proteinanteil in der Mischung den Wert von etwa 0,1, so ist kein Schmelzvorgang mehr zu beobach-

ten, der dem Eutektikum zugeordnet werden kann. Übrig bleibt der Schmelzvorgang im Temperaturbereich oberhalb von -21°C .

Abb. 10 zeigt die Abnahme der Schmelzenthalpie des Eutektikums in einem Protein-NaCl-Wasser-Gemisch in Abhängigkeit von dem Proteinanteil.

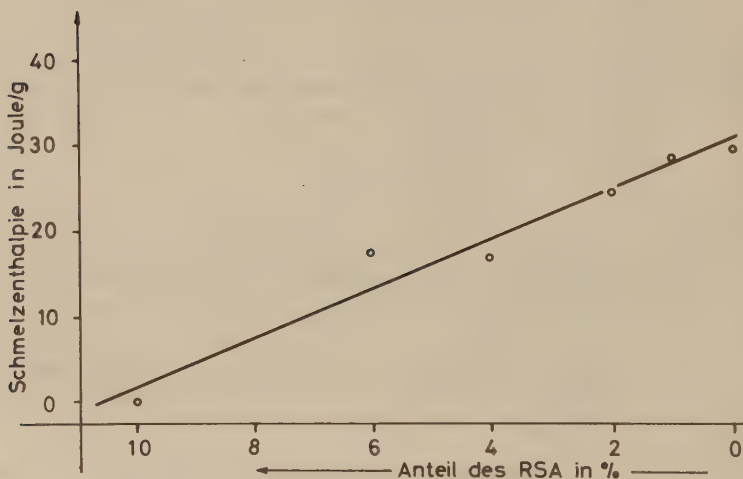


Abb. 10: Abnahme der Schmelzenthalpie des Eutektikums in einem Protein-NaCl-Wasser-Gemisch. Auf der Ordinate ist die Schmelzenthalpie in Joule pro Gramm und auf der Abszisse der Anteil des RSA im Gemisch angegeben.

Die gemessenen Werte können in erster Näherung durch eine Gerade dargestellt werden. Diese Gerade schneidet die Abszisse bei etwa 10, d. h. der Proteinanteil von 0,1 im Gemisch verhindert die Ausbildung eines Eutektikums.

Der Schmelzprozess, der im Temperaturbereich von etwa -20°C bis 0°C abläuft, kann bis zu einem Proteinanteil von 0,7 im Gemisch nachgewiesen werden. Beträgt der Proteinanteil etwa 0,8, so kann überhaupt kein Phasenübergang in dem hier untersuchten Temperaturbereich mehr nachgewiesen werden. Die Schmelzkurven zeigen nur noch einen flachen Verlauf (Abb. 9).

Das im Gemisch noch vorhandene Lösungsmittel ist in seinen kalorischen Eigenschaften derart verändert, daß keine Phasenumwandlungen mehr nachzuweisen sind. Aus diesen Schmelzkurven wurde durch Integration der Wert für die mittlere Enthalpiedifferenz der Mischung für unterschiedliche Zusammensetzungen der Mischung bestimmt. Abb. 11 zeigt das Ergebnis dieser Rechnung.

Die in Abb. 11 eingezeichneten Symbole kennzeichnen Werte, die sich für unterschiedliche pH-Werte des Gemisches ergeben haben. Die pH-Werte betragen 4,75 und 9,5. Außerdem wurden Messungen beim isoionischen Punkt ausgeführt. Das RSA-Molekül trägt dabei die mittlere Ladung $\bar{z}$ von 0 bis -37 (siehe Abb. 2). Die mittlere Enthalpiedifferenz in Abb. 11 ist in Abhängigkeit des Lösungsmittelanteils (0,5 m NaCl-Lösung) aufgetragen. Auf der Abszisse steht daher das Verhältnis des Anteils des Lösungsmittels zur Gesamtmischung in Gramm $\text{g}(\text{H}_2\text{O}+\text{NaCl})/\text{g}(\text{H}_2\text{O}+\text{NaCl}+\text{RSA})$. Im Rahmen der vorliegenden Meßgenauigkeit wurde durch die Meßpunkte, deren Anteile des Lösungsmittels zwischen 0,5 und 1 liegen, eine Gerade eingezeichnet. Der exakte Verlauf der Geraden in Abb. 11 wurde nach der Methode der

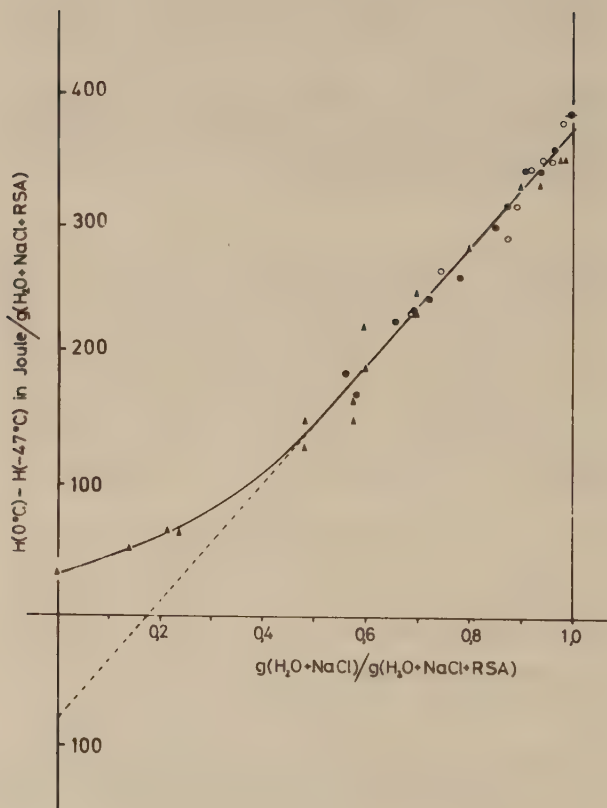


Abb. 11: Mittlere Enthalpiedifferenz einschließlich Schmelz-enthalpie des Gemisches und des Eutektikums von RSA-NaCl-Wasser-Gemischen in Joule pro Gramm in Abhängigkeit vom Gewichtsanteil des Lösungsmittels (0,5 molale NaCl-Lösung). Die Gemische hatten unterschiedlichen pH-Wert.
 ▲ isoionischer pH-Wert; ● pH-Wert 4,75;
 ○ pH-Wert 9,5; ●● reine NaCl-Lösung (0,5 molal).

kleinsten Quadrate berechnet.

Entsprechend wie bei den Untersuchungen der Protein-Wasser-Mischungen ist auch hier die Zusammensetzung des Gemisches von Interesse, bei der keine Phasenumwandlungen mehr nachgewiesen werden können. Diese Zusammensetzung des Gemisches erhält man, indem die Tangente mit der Anfangssteigung der durchgezogenen Kurve in Abb. 11 im Punkte $w = 0$ mit dem linear ansteigenden Teil der Kurve zum Schnitt gebracht wird (siehe Abb. 6). Der Schnittpunkt ergibt für das Lösungsmittel einen Anteil von $w = 0,35$. Umgerechnet auf trockenes Protein bedeutet das für β einen Wert von 0,54 g Lösungsmittel pro Gramm trockenes Protein.

3.34 Analyse einer Protein-NaCl-Wasser-Mischung mit Hilfe der Theorie ternärer Mischungen

Die Bestimmung der Partialenthalpie der beteiligten Komponenten ist das Ziel dieser Analyse. Es wurde schon an anderer Stelle darauf hingewiesen, daß eine vollständige Analyse eines ternären Gemisches zwar möglich aber doch wesentlich aufwendiger ist als die Analyse eines binären Gemisches. Deshalb wurde das vorliegende ternäre Gemisch etwas vereinfacht. Die Vereinfachung besteht darin, daß in dem vorliegenden Wasser-Salz-Protein-Gemisch die Variablen nur das Protein und die Salzlösung sind. Dieses System wird durch die Gleichung (10) vollständig beschrieben. Gleichung (10) zeigt aber auch, daß neben der Partialenthalpie des Proteins nur eine Kombination der Partialenthalpien Wasser und

Salz aus den vorliegenden Experimenten bestimmt werden können. Diese Kombination wird im folgenden als Partialenthalpie des Lösungsmittels bezeichnet.

Die Berechnung der Partialenthalpien erfolgte aus den gemessenen Werten der mittleren Enthalpiedifferenz ΔH der Mischung (siehe Abb. 11). In Abb. 12 sind die Partialgrößen in Abhängigkeit vom Anteil des Lösungsmittels im Gemisch dargestellt.

Übersteigt der Anteil des Lösungsmittels den Wert von 0,5, so verhält sich das zusätzliche Lösungsmittel wie reines Lösungsmittel, also ohne Zusatz von Protein. Die Partialenthalpie ist konstant und ist gleich der mittleren Enthalpiedifferenz des Lösungsmittels. Dieser Wert ist etwa 10 % kleiner als die Enthalpiedifferenz des Wassers in dem hier untersuchten Temperaturbereich. Beträgt der Anteil des Lösungsmittels in der Mischung weniger als 0,5, so gerät das Lösungsmittel in den Einfluß der Wechselwirkungskräfte, die von drei Komponenten herrühren, Wasser, Salz und Protein. Die Partialenthalpie nimmt dann ab.

Die Partialenthalpie des RSA in der Mischung $\partial \Delta H / \partial g(\text{RSA})$ nimmt mit zunehmendem Anteil des Lösungsmittels ab. Bis etwa $w = 0,2$ ist die Partialenthalpie konstant, durchläuft bei etwa $w = 0,35$ den Wert Null, um in verdünnten Mischungen einen negativen Wert anzunehmen. In Gemischen, deren Anteil des Lösungsmittels den Wert von etwa 0,5 übersteigt, ist die Partialenthalpie des

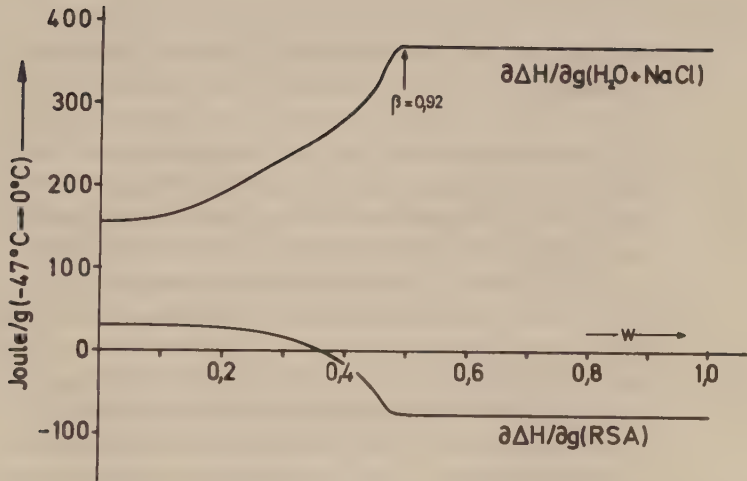


Abb. 12: Partialenthalpie des Lösungsmittels $\partial\Delta H/\partial g(\text{H}_2\text{O}+\text{NaCl})$ und des RSA $\partial\Delta H/\partial g(\text{RSA})$ in einem Gemisch, dessen Zusammensetzung auf der Abszisse angegeben ist. Das Lösungsmittel ist eine 0,5 m NaCl-Lösung. Der Ordinatenwert ist in Joule pro Gramm der Komponenten angegeben. (Weitere Ausführungen im Text).

RSA $\partial\Delta H/\partial g(\text{RSA})$ negativ und konstant. Der Wert ist -79,8 Joule/g.

Welche Information aus diesen Größen über das Verhalten der einzelnen Komponenten in der Mischung gewonnen werden kann, wird in der folgenden Diskussion dargelegt.

3.40 Diskussion der Ergebnisse an Modellsystemen

3.41 Kalorische Eigenschaften einer Protein-Wasser-Mischung

Die vorliegenden kalorischen Untersuchungen an dem binären Gemisch Wasser-Protein zeigen, daß Wasser in einer Proteinlösung unterschiedliches kalorisches Verhalten aufweist. Wasser, das in dem untersuchten Temperaturbereich von -47°C bis 0°C keine Phasenübergänge aufweist, besitzt kalorische Eigenschaften, die sich von denen des freien Wassers unterscheiden. Es liegt in einem anderen thermodynamischen Zustand vor. Dieses Wasser wird als "kalorisch gebundenes" Wasser bezeichnet, wobei das Wort "kalorisch" auf die Meßmethode hinweist und das Wort "gebunden" im Sinne von "anders als frei" zu verstehen ist. Die freie Enthalpie des Systems Makromolekül und "kalorisch gebundenes" Wasser hat ein Minimum - bei konstantem p und T - . Die freie Enthalpie ($G = H - TS$) enthält einen enthalpischen und einen entropischen Beitrag. Beide sind an dem thermodynamischen Zustand des "kalorisch gebundenen" Wassers beteiligt.

Abb. 5 gibt einen ersten Anhaltspunkt dafür, wie groß der Anteil des "kalorisch gebundenen" Wassers in einem RSA-Wasser-Gemisch ist. Bei einem Wasseranteil von etwa $\beta = 0,41$ g Wasser pro Gramm RSA kann kein Phasenübergang mehr nachgewiesen werden, obwohl im Gemisch Wasser enthalten ist. Das Verschwinden des Schmelzpeaks in Abb. 5 kann nicht sehr zuverlässig sein, da die Nachweisgrenze des Kalorimeters die Genauigkeit, mit der der Anteil w bestimmt wird, beeinträchtigt.

Eine bessere Näherung zur Ermittlung des Anteils w , bei dem gerade noch kein Phasenübergang auftritt, ist in Abb. 6 dargestellt. Die Tangente mit der Anfangssteigung der Meßkurve im Punkte $w = 0$ wird mit dem linear ansteigenden Teil der Kurve zum Schnitt gebracht. Durch diesen Schnittpunkt wird ein Anteil "kalorisch gebundenes" Wasser definiert. Der Schnittpunkt der beiden Geraden ergibt für w einen Wert von 0,23 und für β entsprechend 0,29 g Wasser pro Gramm Protein.

Diese Zahlenwerte für die Größe β von 0,41 bzw. 0,29 geben lediglich die Masse des "kalorisch gebundenen" Wassers an. Das vorliegende Experiment läßt keine Aussagen über die Anordnung des "kalorisch gebundenen" Wassers um das Makromolekül oder sogar über die Art der Bindung zu. Die Enthalpiemessung gibt eine integrale Aussage über das thermodynamische Verhalten des Makromoleküls in dem betreffenden Temperaturintervall.

Aussagen über den thermodynamischen Zustand der Komponenten im Gemisch in Abhängigkeit von der Zusammensetzung ergeben die Partialgrößen. Die Partialgrößen $\partial H / \partial g(\text{H}_2\text{O})$ und $\partial H / \partial g(\text{RSA})$ sind in Abb. 7 dargestellt. Die obere Kurve in Abb. 7 beschreibt das Verhalten des Wassers im Gemisch. Die Untersuchungen haben ergeben, daß in Mischungen, deren Wassergehalt w größer als 0,35 ist, die Partialenthalpie konstant ist. Die Partialenthalpie ist in diesen Mischungen gleich der Enthalpiedifferenz des freien Wassers. Das bedeutet, daß bei Zugabe von Wasser in

solchen Mischungen sich dieses im Raum des freien Wassers verteilt ohne mit der anderen Komponente - der Proteinkomponente - in Wechselwirkung zu treten. Die kalorischen Eigenschaften dieser neu hinzugekommenen kleinen Menge Wasser - die Menge dieses Wassers muß so klein sein, daß die Zusammensetzung der Mischung praktisch unverändert bleibt - sind gleich den kalorischen Eigenschaften des freien Wassers. Wird diese "kleine Menge" Wasser im Gemisch verteilt erwärmt, so ist eine bestimmte Wärmemenge erforderlich. Dieselbe Wärmemenge wird aber auch dann benötigt, wenn diese "kleine Menge" Wasser getrennt vom Gemisch erwärmt wird und zu der Wärmemenge, die zur Erwärmung des Gemisches allein benötigt wird, addiert wird. Das ist die physikalische Aussage, daß die Partialenthalpie des Wassers gleich der Enthalpiedifferenz des freien Wassers ist.

Mit abnehmendem Wasseranteil im Gemisch wird auch der Raum des freien Wassers kleiner. Diese Abnahme des Wasseranteils, der mit der Proteinkomponente nicht in Wechselwirkung steht, wird durch die lineare Abnahme der mittleren Enthalpiedifferenz der Mischung in Abb. 6 beschrieben. In diesem Konzentrationsbereich der Mischung - $0,35 < w \leq 1$ - ist die Schmelzenthalpie des Eises der wesentliche Beitrag zu ΔH . Sobald die Meßkurve in Abb. 6 nicht mehr durch eine Gerade beschrieben werden kann, beginnen sich die ersten Wechselwirkungen zwischen der Protein- und der Wasserkomponente bemerkbar zu machen. Die Partialenthalpie $\partial \Delta H / \partial g(\text{H}_2\text{O})$ ist nicht mehr konstant und gleich der Enthalpiedifferenz des freien Wassers sondern ändert seinen Wert (siehe Abb. 7).

Die Änderung der Partialenthalpie ist gleichbedeutend mit der Aussage, daß sich die kalorischen Eigenschaften des Wassers ändern. Die in Abb. 7 dargestellte Abnahme der Partialenthalpie des Wassers beruht auf folgendem Verhalten der Wasserkomponente in der Mischung. Bei Zugabe von Wasser in ein hochkonzentriertes Protein-Wasser-Gemisch mit $w < 0,35$, liegt nur noch ein geringer Anteil des Wassers als freies Wasser vor, das einen Phasenübergang vom festen in den flüssigen Zustand aufweist. Der weitaus größere Anteil steht in starker Wechselwirkung mit der Proteinkomponente, so daß es zu keiner Ausbildung einer Eisphase mehr kommen kann. Der Einfluß dieser Wechselwirkung zwischen der Protein- und der Wasserkomponente macht sich bereits bei einem Wasseranteil von $w = 0,35$ in der Mischung bemerkbar. Beim Schmelzen dieser Mischungen sind durchaus noch Phasenübergänge zu registrieren. Erst bei einem Wasseranteil von $w = 0,29$ ist kein Phasenübergang mehr nachzuweisen. In diesem Übergangsbereich der Mischungen mit einem Wasseranteil von $0,29 \leq w \leq 0,35$ werden die Phasenübergänge durch die benachbarten Protein-Moleküle schon stark gestört.

Zur Beschreibung des thermodynamischen Zustandes des Wassers in einem binären Protein-Wasser-Gemisch kann man nach Abb. 7 folgende Unterteilung vornehmen. Es gibt Wasser, das sich wie freies Wasser verhält und Wasser, dessen kalorische Eigenschaften von denen des freien Wassers verschieden sind. Der Anteil des Wassers, der unter dem Einfluß der Wechselwirkungskräfte steht, ist 0,35. Umgerechnet auf trockenes Protein ergibt

sich der Wert für $\beta = 0,54$ g Wasser pro Gramm RSA. Die Zuordnung dieses Wasseranteils zu einem RSA-Molekül führt zu einer geometrischen Vorstellung der räumlichen Verteilung dieser Wassermenge. Unter der Annahme, daß das RSA-Molekül eine kugelförmige Gestalt hat, wird sich das kalorisch veränderte Wasser in einer Kugelschale um das RSA-Molekül anlagern. Bei der Radius des RSA-Moleküls etwa $27 \cdot 10^{-8}$ m rechnet sich für die Dicke der Wasserschale vorausgesetzt die Dichte dieses Wassers nicht wesentlich von 1 verschieden RSA-Molekül ein Wert von etwa $5,4 \cdot 10^{-8}$ m. Ein RSA-Molekül ist nach dieser Vorstellung "Wasseratmosphäre" umgeben, deren Dicke 20 % des Molekülradius beträgt. In größerem Abstand als $5,4 \cdot 10^{-8}$ m von der Oberfläche des RSA-Moleküls entfernt, treten keine Wechselwirkungen zwischen dem RSA-Molekül und den Wassermolekülen mehr auf.

Die Partialenthalpie des Wassers hat mit 424,6 Joule/g seinen größten Wert und erreicht mit abnehmendem Anteil des Wassers im Gemisch seinen kleinsten Wert von etwa 142,3 Joule/g. Diese Änderung der Partialenthalpie bezieht sich auf Wasser, das sich innerhalb der "Wasseratmosphäre" befindet. Durch die Bildung eines Integralmittelwertes über den Konzentrationsbereich von $w = 0$ bis $w = 0,35$ wird ein effektiver Wert für die Menge des "kalorisch gebundenen" Wassers definiert. Es ergibt sich ein Wert für β von 0,28 (siehe Abb. 7). Dieser Wert ist praktisch gleich dem Wert, der nach der Methode des Tangentschnittpunktes gewonnen wurde.

Berechnet man unter den oben gemachten Annahmen für die Wassermenge von $\beta = 0,28$ g Wasser pro Gramm RSA die Dicke der Wasserschicht um ein RSA-Molekül, so ergibt sich ein Wert von etwa 3 Å. Diese Wasserschicht entspricht etwa einer monomolekularen Schicht.

In der folgenden Tabelle 3 sind die Werte für die Menge des an das RSA "kalorisch gebundene" Wasser zusammengefaßt.

Tabelle 3

Verfahren	β in g(H ₂ O)/g(RSA)	$\Delta R/R$
Tangentenschnittpunkt	0,29 $\pm$ 17 %	0,11
Integralmittelwert	0,28 $\pm$ 5 %	0,11
erstes Auftreten der Schmelzenthalpie	0,41	0,15
gesamte Atmosphäre	0,54 $\pm$ 5 %	0,20

Der Wert für $\beta = 0,41$ ist ein erster Orientierungswert und sicherlich zu hoch. Da dieser Wert von der Empfindlichkeit des Gerätes abhängt, wurde von einer Fehlerangabe abgesehen. R ist der Radius des RSA-Moleküls und beträgt 27,5 Å, $\Delta R/R$ ist die relative Schichtdicke des Wassers um das RSA-Molekül.

Kalorische Untersuchungen über die Hydratation von Makromolekülen liegen von MREVLISHVILI und Mitarbeitern vor [44]. Zur Bestimmung des "gebundenen" Wassers haben die Autoren Mischungen aus Wasser und Proteinen eingefroren und den Anteil

des nicht gefrorenen Wassers bestimmt. Dazu haben sie die spezifische Wärme der Mischungen in einem Temperaturbereich von etwa -20°C bis 5°C gemessen. Abb. 13 zeigt die Wärmekapazität von 1 g Prokollagen als Funktion der Temperatur bei unterschiedlichem Wassergehalt.

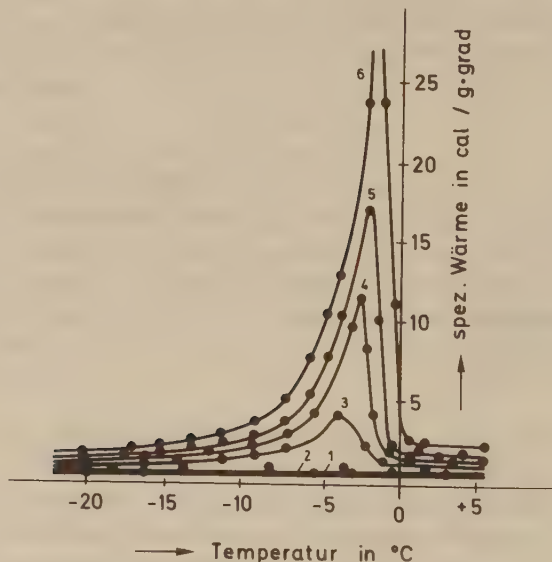


Abb. 13: Wärmekapazität von 1 g Prokollagen als Funktion der Temperatur. Die Proben haben unterschiedlichen Wassergehalt.
Kurve 1: 0 g; Kurve 2: 0,35 g; Kurve 3: 0,64 g;
Kurve 4: 0,93 g; Kurve 5: 1,26 g; Kurve 6: 2,0 g;

Die Wärmekapazität des trockenen Prokollagens (Kurve 1) zeigt einen linearen Verlauf im untersuchten Temperaturbereich. Selbst die Zugabe von

0,3 g Wasser pro Gramm Prokollagen ändert den Verlauf der Wärmekapazität nicht und es ist auch keine zusätzliche Wärme erforderlich in dem Temperaturbereich, in dem Eis schmilzt. Das System enthält also kein freies Wasser. Ein merklich erhöhter Wärmeverbrauch tritt erst dann auf, wenn der Wasseranteil etwa 0,6 beträgt (Kurve 3, Abb. 13). Mit zunehmendem Wassergehalt wandert das Maximum der Wärmekapazität zur Schmelztemperatur des Eises. In der Tabelle 4 sind für verschiedene Moleküle die Mengen des gebundenen Wassers angegeben. Die dritte Spalte enthält die Dicken der Wasserschichten um die Moleküle. Sie wurden aus der beobachteten Hydratation der Moleküle und den geometrischen Parametern der nativen Moleküle berechnet. Dabei wurde vorausgesetzt, daß das Molekül von einer kompakten Wasserhülle ringsum eingeschlossen ist. Die Dicken der Wasserschichten liegen bei 1 bis 2 Molekülschichten.

Tabelle 4

	g Wasser pro g trockenes Protein ± 0,005	Dicke der Hydrathülle in Å
Prokollagen	0,465	2,8
Serumalbumin	0,315	3,2
Eialbumin	0,323	3,4
Hämoglobin	0,324	3,8

Für Serumalbumin erhalten die Autoren für die Menge des "gebundenen" Wassers einen Wert von 0,315 g Wasser pro Gramm Serumalbumin. Dieser Wert stimmt mit den Angaben in der Tabelle 3 gut überein.

Die Zunahme der Hydratation bei den nicht globulären Proteinen wie z. B. Prokollagen führen die Autoren auf eine ausgedehntere Kontaktfläche zwischen den Makromolekülen und den Wassermolekülen zurück. Weiteren Einfluß auf eine erhöhte Hydratation sollen auch Ladungskonzentrierung und die Größe der einzelnen Ladungen haben.

BULL und Mitarbeiter [7] haben ebenfalls kalorische Untersuchungen an Protein-Wasser-Gemischen durchgeführt. Die Autoren haben die spezifische Wärme von Eialbumin-Wasser-Gemischen als Funktion des Wasseranteils im Gemisch untersucht und im Temperaturbereich von einigen Graden unter 0°C den Anteil des nicht gefrorenen Wassers bestimmt. Die Menge des Wassers pro Gramm Eialbumin, die nicht gefriert, ist - nach den Angaben von BULL und Mitarbeitern - unabhängig vom Proteinanteil im Gemisch, ändert sich aber mit der Einfriertemperatur. In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengestellt.

Tabelle 5

Einfriertemperatur in $^{\circ}\text{C}$	-1	-3	-5	-7
Wasser pro Gramm Protein	0,60	0,51	0,45	0,41

Aus der Tabelle 5 ist zu entnehmen, daß mit sinkender Temperatur der Wasseranteil, der nicht ausfriert, ebenfalls abnimmt und einem Grenzwert zustrebt. Der hier angegebene Wert von 0,41 liegt noch merklich über dem Wert von 0,323, den MREVLISHVILI und Mitarbeiter [44] gefunden haben.

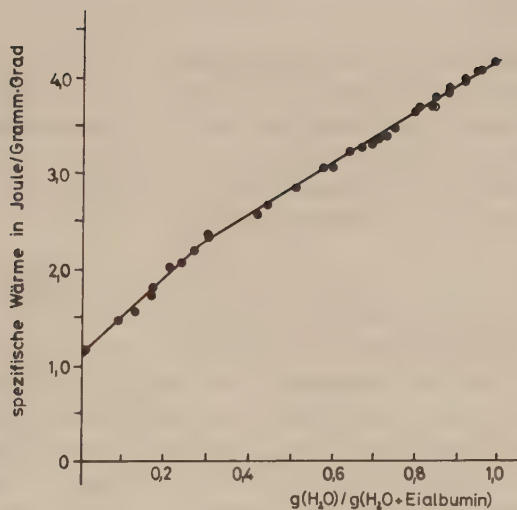


Abb. 14: Spezifische Wärme von Protein-Wasser-Gemischen als Funktion vom Wassergehalt der Proben. Die Messung erfolgte über einen Temperaturbereich von $-3^{\circ}C$ bis $+25,5^{\circ}C$.

Als weiteres Ergebnis erhalten die Autoren die spezifische Wärme von Protein-Wasser-Gemischen in Abhängigkeit vom Wasseranteil. Diese Messungen beziehen sich auf einen Temperaturbereich von $-3^{\circ}C$ bis $+25,5^{\circ}C$. Die von den Autoren gemessene spezifische Wärme ist eher als eine mittlere spezifische Wärme des Gemisches aufzufassen. In Abb. 14 ist der Verlauf dieser mittleren spezifischen Wärme als Funktion des Wasseranteils im Gemisch dargestellt. Dieser Verlauf ist besonders dadurch ausgezeichnet,

daß der Kurvenverlauf eine konvexe Krümmung aufweist.

MILBERS [41, 42] hat mit einem selbstgebauten Präzisionskalorimeter die spezifische Wärme des RSA-Wasser-Gemisches als Funktion des Wasseranteils in der Mischung bestimmt. Abb. 15 zeigt den Verlauf der spezifischen Wärme des Gemisches in Abhängigkeit von dem Wasseranteil.

Der Verlauf in Abb. 15 bestätigt vollkommen die von BULL und Mitarbeitern gemessene Kurve mit der konvexen Krümmung. Die Meßpunkte in Abb. 15 sind durch zwei Geraden angenähert. Der Schnittpunkt dieser beiden Geraden unterteilt die RSA-Wasser-Gemische in zwei Bereiche. Diese Bereiche unterscheiden sich in den kalorischen Eigenschaften der Komponenten im Gemisch sehr wesentlich voneinander. Nach der Theorie binärer Mischungen [20, 57] ergibt die von MILBERS [42] durchgeführte Analyse, daß in verdünnten Gemischen, die partielle spezifische Wärme des Wassers im Gemisch gleich der spezifischen Wärme des Wassers selbst ist. Diese Aussage ist für den gesamten Konzentrationsbereich gültig, in dem der Wasseranteil größer als 0,25 ist. Bringt man also in verdünnte RSA-Wasser-Gemische zusätzlich Wasser, so treten zwischen diesen Wasser- und den RSA-Molekülen keine Wechselwirkungen auf. Es wird lediglich den Lösungsraum erweitern.

Bei der Bestimmung der mittleren Enthalpiedifferenzen von wässrigen RSA-Gemischen ergaben sich genau dieselben Aussagen (siehe Seite 43).

In Mischungen dagegen, die nur wenig Wasser ent-

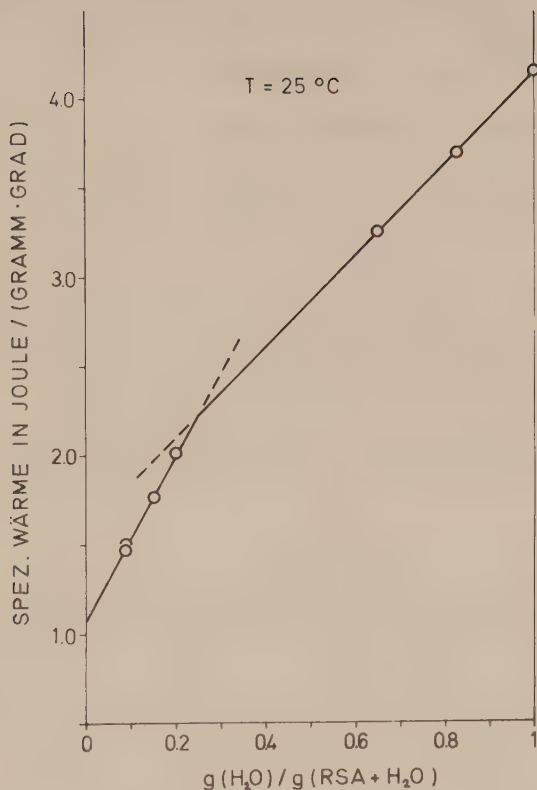


Abb. 15: Spezifische Wärme von RSA-Wasser-Gemischen als Funktion des Wasseranteils im Gemisch. Auf der Ordinate ist die spezifische Wärme in Joule pro Gramm und Grad und auf der Abszisse der Wasseranteil des Gemisches aufgetragen. Die Kurve ist bei einer Temperatur von 25 °C gemessen.

halten, der Wasseranteil also kleiner als 0,25 ist, zeigt die partielle spezifische Wärme ein ganz anderes Verhalten. Sie ist größer als die spezifische Wärme des Wassers.

Das Wasser in unmittelbarer Umgebung des RSA-Moleküls wird kalorisch derart verändert, daß zu dessen Erwärmung mehr Energie erforderlich ist als zur Erwärmung von reinem Wasser.

Modellvorstellungen, die diesen auffallend hohen Wert der partiellen spezifischen Wärme des "gebundenen" Wassers zu beschreiben versuchen, stammen u. a. von FRANK und WEN-YANG [13], FRANK und EVANS [14], TANFORD [64] und ERLANDER [12]. Nach deren Vorstellungen existieren neben den Ionen-Dipol-Wechselwirkungskräften noch weitere Wechselwirkungskräfte zwischen den Wassermolekülen und dem gelösten Stoff. So ist der 'strukturbildende' Einfluß der nicht-polaren Gruppen eines Makromoleküls dafür verantwortlich, daß das sich in Molekülnähe befindliche Wasser eine vermehrte Anzahl von Wasserstoffbrücken-Bindungen ausbildet. Bei der Erwärmung dieses Wassers ist nun ein erheblicher Teil an Energie erforderlich, um die Wasserstoffbrücken-Bindungen zu 'schmelzen'. Solche Modellvorstellungen, deren Diskussion nicht Anliegen dieser Arbeit ist, versuchen eine Erklärung für diesen anomalen großen Wert der partiellen spezifischen Wärme des "gebundenen" Wassers zu geben.

Der Schnittpunkt der beiden Geraden in Abb. 15 (bzw. Abb. 14) gibt den Anteil des Wassers in

der Mischung an, der kalorisch verändert ist. Die von MILBERS [42] durchgeführten Messungen haben gezeigt, daß dieser Anteil des Wassers im Gemisch von der Temperatur des Gemisches abhängig ist. In Abb. 16 ist die Temperaturabhängigkeit der Menge des kalorisch veränderten Wassers dargestellt.

Mit steigender Temperatur erreicht die Kurve asymptotisch einen Wert von etwa 0,28 g Wasser pro Gramm RSA. Dieser Wert entspricht genau dem Wert, der sich bei der Bestimmung der mittleren Enthalpiedifferenz von RSA-Wasser-Gemischen im Temperaturbereich von -47°C bis 0°C als Wert für das "kalorisch gebundene" Wasser ergeben hat. Dieser Wasseranteil in unmittelbarer Umgebung des RSA-Moleküls zeigt keine Phasenübergänge mehr.

Dieses "kalorisch gebundene" Wasser, das sich in sehr engen Kontakt mit dem Proteinmolekül befindet, ist offensichtlich unabhängig von der Temperatur des Gemisches. Davon unabhängig baut sich eine temperaturabhängige 'Atmosphäre' auf. Mit sinkender Temperatur des Gemisches nimmt die thermische Energie des Moleküls ab und die Wechselwirkungskräfte beginnen zu überwiegen. Der Einfluß dieser Wechselwirkungskräfte macht sich weiter im freien Raum des Wassers bemerkbar. Diese 'Wasseratmosphäre', deren Dicke von der Temperatur abhängig ist, bildet einen kontinuierlichen Übergang von dem "kalorisch gebundenen" Wasser in den Raum des freien Wassers. Bei einer Temperatur von 5°C erreicht die unter dem Einfluß der Wechselwirkungskräfte

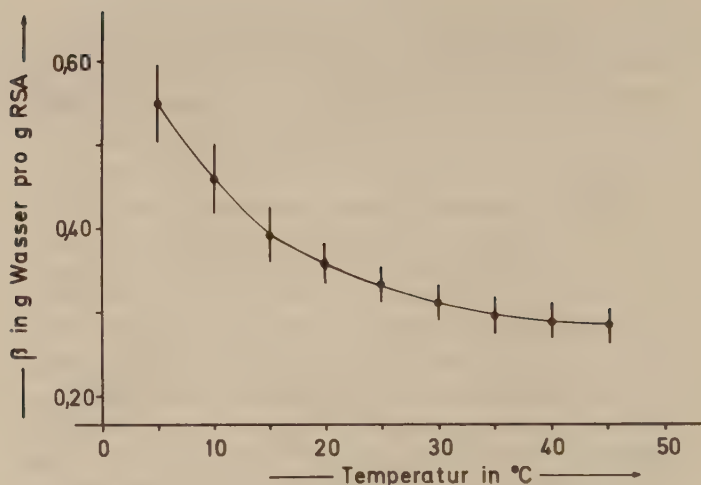


Abb. 16: Menge des kalorisch veränderten Wassers in Gramm pro Gramm RSA in Abhängigkeit von der Temperatur des Gemisches.

stehende Wassermenge einen Wert von etwa 0,55 g Wasser pro Gramm RSA (siehe Abb. 16).

Bei der Diskussion der berechneten Partialenthalpie des Wassers in RSA-Wasser-Gemischen (siehe Abb. 7) führte eine Modellvorstellung ebenfalls zur Ausbildung einer 'Atmosphäre' um das Makromolekül. Innerhalb dieser 'Atmosphäre' ändert sich die Partialenthalpie des Wassers. Das ist ein Hinweis darauf, daß das Wasser unter dem Einfluß der Wechselwirkungskräfte steht. Erreicht die Wassermenge einen Wert von $\beta = 0,54$ g Wasser pro Gramm RSA, so bleibt die Partial-

enthalpie des Wassers bei weiterer Zugabe von Wasser konstant. Die beiden gemessenen Werte für β stimmen im Rahmen der hier vorliegenden Meßgenauigkeiten recht gut überein.

Daß das gesamte Wasser in dieser 'Atmosphäre' nicht als "kalorisch gebunden" bezeichnet wird, ergibt die Untersuchung der Phasenübergänge. Diese temperaturabhängige 'Wasseratmosphäre' enthält noch Wasser, das Phasenübergänge aufweist (siehe Abb. 5 und Abb. 6).

3.42 Kalorische Eigenschaften der Protein-Komponente im Gemisch

Das thermodynamische Verhalten der zweiten Komponente im Gemisch, das RSA, wird durch die untere Kurve in Abb. 7 beschrieben. Für verdünnte Lösungen ist die Partialenthalpie für RSA im Gemisch negativ. Dieser Wert ist für den Konzentrationsbereich der Mischung mit einem Wasseranteil von 0,65 bis zu hochverdünnten Lösungen konstant und beträgt $-48,1$ Joule pro Gramm RSA. Dieser negative Wert von $\partial \Delta H / \partial g(\text{RSA})$ kommt folgendermaßen zustande:

Wird in ein verdünntes Protein-Wasser-Gemisch ein RSA-Molekül hinzugegeben, so bildet sich um dieses RSA-Molekül ein Bereich aus, dessen Wasser unter dem Einfluß der Wechselwirkungskräfte steht. Dieses Wasser, das dem Raum des freien Wassers entnommen wurde, weist keinen Phasenübergang vom festen in den flüssigen Zustand auf. Der Verlust dieses freien Wassers und damit der Verlust der entsprechenden Schmelzenthalpie

überwiegt die Zunahme der Enthalpiedifferenz durch den Gewinn eines RSA-Moleküls zusammen mit seiner Hydrathülle. Dieses Verhalten des RSA-Moleküls in wässriger Lösung wird durch den negativen Wert der Partialenthalpie des RSA beschrieben, dessen Wert $-48,1$ Joule pro Gramm beträgt. Mit zunehmender Konzentration des RSA im Gemisch durchläuft die Partialenthalpie einen Zwischenbereich, um danach einen Endwert von $+33,4$ Joule pro Gramm zu erreichen. Dieser Wert entspricht dem trockenen und unveränderten Protein.

Das Protein-Molekül liegt offensichtlich im Grenzfall in zwei verschiedenen Zuständen vor, die von dem umgebenden Wasser bestimmt werden. Der eine Zustand entspricht dem Verhalten des RSA-Moleküls im trockenen Zustand. In verdünnten Lösungen liegt das RSA-Molekül in seinem anderen Zustand vor.

Nach den Ergebnissen der Untersuchungen von MILBERS [42] zeigt die partielle spezifische Wärme des RSA im Gemisch (siehe Abb. 15) ein entsprechendes Verhalten. In einem trockenen bzw. feuchten Protein-Gemisch ist die partielle spezifische Wärme des RSA unverändert und gleicht der spezifischen Wärme des RSA. Die partielle spezifische Wärme des RSA in verdünnten Lösungen dagegen ist verändert und etwas größer als die des trockenen RSA.

Dasselbe Verhalten der Protein-Komponente ist auch aus den Untersuchungen von BULL und Mitarbeitern zu entnehmen (siehe Abb. 14) und

sinngemäß auf die Wasser-Komponente im Gemisch übertragbar.

Die Veranschaulichung einer ausgebildeten Hydrathülle durch eine kompakte Schale um ein Protein-Molekül ist sicherlich in einer solchen vereinfachenden geometrischen Form nicht ganz richtig.

In einer Mischung von 0,5 Anteilen Wasser und 0,5 Anteilen RSA liegen folgende räumliche Verhältnisse vor:

Ein Gramm dieses Gemisches nimmt ein Volumen von etwa $0,875 \text{ cm}^3$ ein. Davon entfallen $0,375 \text{ cm}^3$ auf das Volumen der Protein-Moleküle. Nach den bisherigen Vorstellungen hat jedes RSA-Molekül in Lösung eine kompakte Hydrathülle, so daß der effektive Radius eines RSA-Moleküls um etwa $3 \text{ \AA}$ größer ist.

Addiert man die Zahl der Volumina von Würfeln, die jeweils ein RSA-Molekül mit einer Hydrathülle enthalten, so ergibt sich für die im Gemisch gelösten RSA-Moleküle ein Gesamtvolumen von etwa $0,986 \text{ cm}^3$. Diese regelmäßige Anordnung der Moleküle in der Lösung sowie die kugelförmige Gestalt ist sicherlich nicht zutreffend, so daß der errechnete Wert für das Gesamtvolumen nur einer Abschätzung gleich zu setzen ist.

Diese Überlegung soll jedoch deutlich machen, daß in einem solchen Gemisch die Moleküle doch sehr dicht gedrängt sind. Und in einer solchen dichtgedrängten Anordnung der hydratisierten Moleküle verhält sich zusätzlich hinzugefügtes Wasser wie in einer hochverdünnten Lösung.

Die Untersuchungen haben ergeben, daß die Partialenthalpie (siehe Abb. 7) und die partielle spezifische Wärme des Wassers (siehe Abb. 15) in diesem Konzentrationsbereich konstant sind.

3.43 Kalorische Eigenschaften einer Protein-Salz-Wasser-Mischung

Die Zugabe von Salz zu einem Protein-Wasser-Gemisch ist eine erste Erweiterung des einfachen Zytoplasma-Modells, das in seiner ersten Näherung nur aus zwei Komponenten bestand. Zur Vereinfachung der Analyse eines ternären Gemisches wurde als Lösungsmittel eine Salzlösung konstanter Konzentration gewählt. Durch diese Einschränkung ergibt die Analyse des Gemisches nach Gleichung (10) nur Aussagen über das Verhalten des RSA im Gemisch und über das Verhalten des Lösungsmittels im Gemisch. Eine Aufspaltung der Effekte auf die drei beteiligten Komponenten ist unter diesen gegebenen Versuchsbedingungen ausgeschlossen. Die Konzentration der 0,5 molalen NaCl-Lösung, die im Hinblick auf den Salzgehalt des Zytoplasmas einer Zelle doch sehr hoch ist, wurde gewählt, um auch Veränderungen des eutektischen Gemisches mit zu erfassen.

Das Eutektikum einer Salzlösung schmilzt bei einer bestimmten Temperatur und der Schmelzprozeß ist als ein scharfer Phasenübergang zu erkennen (siehe Abb. 8 und Abb. 9). Mit zunehmendem Proteinanteil verschwindet der Schmelzpeak des Eutektikums. Das anfangs als "Verunreinigung" auftretende RSA führt zu einer Abnahme der Amplitude der Schmelzenthalpie und der Schmelzprozeß erstreckt sich über einen ausgedehnteren

Temperaturbereich (siehe Abb. 9). Die Schmelz-enthalpie des Eutektikums nimmt annähernd linear mit zunehmendem RSA-Anteil im Gemisch ab (siehe Abb. 10). Erreicht der Proteinanteil etwa 10 %, so ist kein Phasenübergang mehr nachzuweisen, der dem Eutektikum des Salzes zugeordnet werden kann. Dieser Proteinanteil ist verhältnismäßig gering im Vergleich zum Proteingehalt einer Zelle, wenn man bedenkt, daß der Salzgehalt im Zytoplasma doch wesentlich geringer ist als in der hier untersuchten Modelllösung.

Der Schmelzprozeß des Lösungsmittel-RSA-Gemisches erstreckt sich über einen ausgedehnten Temperaturbereich und nimmt langsam mit zunehmendem Protein-Gehalt ab (siehe Abb. 9). Die mittlere Enthalpiedifferenz des Gemisches in Abhängigkeit von dem Anteil des Lösungsmittels im Gemisch zerfällt, wie bei einem Protein-Wasser-Gemisch, in zwei Bereiche. Ein linear ansteigender Teil der Kurve beschreibt das Verhalten der mittleren Enthalpiedifferenz in verdünnten Gemischen, während mit zunehmendem Protein-Anteil im Gemisch die Kurve einen flacheren Verlauf zeigt.

In Analogie zur Untersuchung des Wasser-RSA-Gemisches (siehe Seite 29), ist auch hier die Zusammensetzung des Gemisches von besonderem Interesse, bei der kein Phasenübergang mehr nachzuweisen ist. Der jetzt interessierende Phasenübergang rührt von der Umwandlung von Eis in Wasser im Gemisch her. Nach dem auf Seite 35 beschriebenen Verfahren (Schnittpunkt zweier Tangenten) ergibt sich für die Zusammensetzung des Gemisches ein Wert von 0,54 g Lösungsmittel

pro Gramm RSA. Der Zusatz des Salzes in einer Protein-Wasser-Mischung führt dazu, daß pro RSA-Molekül eine merklich größere Menge an Lösungsmittel unter dem Einfluß der Wechselwirkungskräfte steht. Unter der Annahme, daß in einem solchen Gemisch der Schmelzprozeß aus dem Schmelzen von Eis besteht, ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit der Anteil des Wassers, der nicht ausfriert, stark erhöht.

CHATTORAJ und BULL [8] haben kalorimetrische Untersuchungen an dem System DNA-Wasser-Salzlösung durchgeführt. Durch unterschiedliche Mengen von Salzen im Gemisch haben die Autoren den Einfluß der Salzkomponente auf das "gebundene" Wasser untersucht. Sie fanden, daß die Menge des ungefrorenen Wassers pro Gramm DNA bei einer bestimmten Temperatur unabhängig von der Menge des Wassers selbst ist, solange die Gesamtmenge des Wassers den Anteil des ungefrorenen Wassers übersteigt. Das neu hinzukommende Wasser geht also keine weiteren Wechselwirkungen mit dem gelösten Stoff ein. Weiter ergaben ihre Messungen, daß die Menge des nicht gefrierbaren Wassers in einer DNA-Salzlösung sehr stark zunimmt, wenn die Konzentration anorganischer Salze in der Lösung erhöht wird. In Abb. 17 ist für die Salze NaCl und KCl die Zunahme des nicht gefrierbaren Wassers in Molen n_{H_2O} in Abhängigkeit von der Gesamtzahl der Mole n_i des Salzes aufgetragen.

Für geringe Elektrolytkonzentrationen scheint die Zahl der Mole n_{H_2O} linear mit zunehmendem Salzgehalt zuzunehmen, während bei höherer

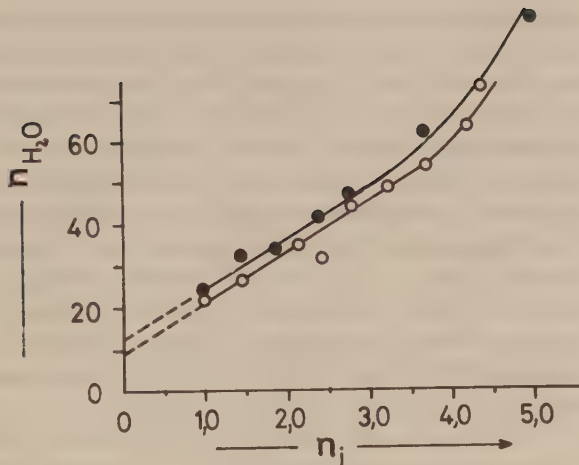


Abb. 17: Zahl der Mole Wasser n_{H_2O} , die nicht gefrieren, als Funktion der Gesamt-molzahl n_i der anorganischen Salze pro Nukleotid in einer DNA-Salzlösung.
 ● Na-DNA+NaCl; ○ K-DNA+KCl;

Konzentration der Elektrolyte die Zahl der Mole n_{H_2O} schneller zunimmt und von der Linearität abweicht. Die gestrichelten Kurven in Abb. 17 stellen eine Extrapolation dar. Für n_i gleich Null ist im Gemisch kein anorganisches Salz enthalten. Die Zahl der nicht gefrierbaren Wassermoleküle beträgt in diesem Zustand 12,5 und 9,0 pro Nukleotid.

3.44 Abhängigkeit des "kalorisch gebundenen" Wassers von der mittleren Ladung des Rinderserumalbumin-Moleküls

Um tieferen Einblick in die Natur der Wechsel-

wirkungskräfte zu erhalten, wurde der pH-Wert des Gemisches verändert. Diese pH-Wertveränderung führt zu einer Änderung der Bilanzladung des RSA-Moleküls. Innerhalb des pH-Wertebereichs von pH 4 bis pH 9 variiert die mittlere Ladung des RSA-Moleküls von +20 bis etwa -35 (siehe Abb. 2). Da das Wassermolekül als ein Dipol aufgefaßt werden kann, könnte man annehmen, daß eine Änderung der mittleren Ladung des RSA-Moleküls sich auf die Menge des "kalorisch gebundenen" Wassers auswirkt. Das kann jedoch nur dann zutreffen, wenn die ladungsabhängigen Kräfte einen merklichen Einfluß auf die Menge des "kalorisch gebundenen" Wassers haben.

Bei wässrigen Elektrolytlösungen haben ERLANDER [12] und SAMOILOV [59] gezeigt, daß die Ionen-Dipol-Kräfte auf die Bildung einer Hydrathülle des Ions Einfluß haben. Nach den Untersuchungen dieser Autoren bildet sich unmittelbar um das Ion eine feste Hydrathülle, an die sich eine zweite, etwas lockerer gebundene Hydrathülle anschließt. Die Ausbildung dieser Hydrathüllen ist sehr unterschiedlich und hängt von dem betreffenden Ion ab. Für ein Natrium-Ion haben die Untersuchungen ergeben, daß im Mittel 3,4 Wassermoleküle unter dem Einfluß der Wechselwirkungskräfte stehen, während es für ein Chlorid-Ion im Mittel 4,4 Wassermoleküle sind [59]. Anhand dieser Zahlen kann man den Anteil des Wassers in einer Elektrolytlösung abschätzen, der nicht mehr als freies Wasser vorliegt. In einer 0,5 molalen NaCl-Lösung beträgt dieser Anteil etwa 7 %.

Im Gegensatz zu diesen Kräften, die in wässrigen Elektrolytlösungen vorherrschen, treten in einem Protein-Wasser-Gemisch Kräfte ganz anderer Natur in den Vordergrund. Es sind nach FRANK und EVANS [14] und anderen Autoren Wechselwirkungskräfte zwischen den nicht-polaren Gruppen am Makromolekül und den Wassermolekülen. Diese Wechselwirkungen lassen daher keine Abhängigkeit des "kalorisch gebundenen" Wassers von der mittleren Ladung des Makromoleküls erwarten.

Die Zahl der dissoziierten Gruppen am RSA-Molekül kann man nach Angaben von TANFORD [64] für einen bestimmten pH-Wert der Mischung berechnen. Eine kleine Änderung der mittleren Ladung des RSA-Moleküls beruht auf einer spezifischen Cl^- -Bindung von einigen Ionen pro RSA-Molekül. Diese spezifische Bindung führt aber zu keiner erheblichen Störung der Anzahl der dissoziierten Gruppen am RSA-Molekül [51]. Für den hier untersuchten pH-Werte-Bereich von pH 4 bis etwa pH 9 ändert sich die Zahl der dissoziierten Gruppen von etwa 150 auf 172. Diese geringe Verschiebung der Zahl der dissoziierten Gruppen hat, wie aus Abb. 11 zu entnehmen ist, keinen merklichen Einfluß auf den Verlauf der mittleren Enthalpiedifferenz des Gemisches.

Die Menge des nicht gefrierbaren Lösungsmittels ist im Rahmen der hier vorliegenden Meßgenauigkeit unabhängig vom Ladungszustand des RSA-Moleküls. Der Einfluß des elektrostatischen Feldes spielt bei der "Wasserbindung" am Makromolekül keine oder nur eine sehr untergeordnete Rolle.

3.45 Die Partialenthalpie des Lösungsmittels im Gemisch

Der Verlauf der Partialenthalpie des Lösungsmittels in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Gemisches (siehe Abb. 12) ist dem Verlauf der Partialenthalpie des Wassers (siehe Abb. 7) sehr ähnlich. Auffallend ist jedoch, daß die Partialenthalpie des Lösungsmittels erst bei einem Anteil des Lösungsmittels von 0,5 einen konstanten Wert annimmt. Dieser Wert ist gleich der Enthalpiedifferenz des Lösungsmittels selbst und hat einen Wert von etwa 384 Joule/g. Er liegt also 10 % unterhalb des Wertes für Wasser. Ein Teil des Wassers ist also durch die Anwesenheit der Elektrolyt-Ionen "kalorisch" verändert.

Fügt man zu einem Gemisch, dessen Lösungsmittelanteil größer als 0,5 ist, noch weiteres Lösungsmittel hinzu, so tritt dieses mit den Proteinemolekülen in keine Wechselwirkung mehr. Es erweitert lediglich den Lösungsraum, die mittlere Enthalpiedifferenz der Mischung nimmt proportional der Lösungsmittelmenge zu (siehe Abb. 11).

Mit abnehmendem Anteil des Lösungsmittels im Gemisch beginnt sich die Partialenthalpie des Lösungsmittels zu ändern, sie nimmt ab (siehe Abb. 12). Die Wechselwirkungskräfte zwischen den drei Komponenten Wasser, Protein und Salz bestimmen den Verlauf der Partialenthalpie. Ordnet man die gesamte Lösungsmittelmenge von etwa 0,5 g pro Gramm Gemisch einem RSA-Molekül zu, so beträgt die Dicke der Solvatationshülle etwa 35 % des Molekülradius des RSA-Moleküls.

Die Berechnung geht von einer kompakten Solvatationshülle aus, deren Dichte gleich 1 ist. Die Bestimmung eines Effektivwertes (siehe Seite 31) für die Menge des "kalorisch veränderten" Lösungsmittels ergibt einen Wert von etwa 0,54 g pro Gramm RSA.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente entscheiden nicht, wie die Solvatationshülle, um bei diesem anschaulichen Modell zu bleiben, aufgebaut ist. Auch in der Literatur gibt es keine eindeutigen Hinweise dafür, ob das "gebundene" Wasser Ionen enthält oder nicht. Es wurde mehrfach darüber berichtet, daß das "gebundene" Wasser den Lösungsraum der kleinen Ionen verringert (vergl. DICK [9]).

Unter der Annahme, daß das "gebundene" Wasser frei von Ionen sei, haben ADAIR und ADAIR [1] über Dichtemessungen an RSA-Salz-Lösungen und ihren Dialysaten 0,47 g 'non solvent' Wasser pro Gramm RSA gefunden. Dieser Anteil des Wassers ist ebenfalls sehr hoch und liegt in der Größenordnung des effektiven Wertes von 0,54 g pro Gramm RSA. Mc MEEKIN und Mitarbeiter [39] kommen nach ausführlichen Messungen an β -Lactoglobulin-, Hämoglobin- und Chymotrypsin-DP-Kristallen in Salzlösungen und nach kritischer Überprüfung zahlreicher Ergebnisse anderer Autoren zu dem Schluß, daß das "gebundene" Wasser in Proteinkristallen sehr von der Nachweismethode abhängig ist. Messungen des Aktivitätskoeffizienten des Salzes in konzentrierten RSA-Lösungen von PFISTER [51] lassen sich dahingehend deuten, daß das "gebundene" Wasser keine

oder nur sehr wenige Ionen gelöst enthält.

Die physikalisch-chemischen Nachweismethoden beruhen meist auf der Annahme, daß das in die Lösung eingebrachte Salz sich nur im freien Wasser ungehindert verteilen kann. Diese Verfahren bezeichnen definitionsgemäß den Anteil des Wassers, der für die kleinen Ionen nicht als Lösungsraum zur Verfügung steht, als "gebundenes" Wasser.

3.46 Partialenthalpie des RSA im Lösungsmittel-Protein-Gemisch

In relativ dünnen Gemischen, in denen der Lösungsmittelanteil einen Wert von 0,5 überschreitet, ist die Partialenthalpie des RSA negativ. Der Wert von $-79,8$ Joule/g ist um etwa 66 % größer als der Wert der Partialenthalpie des RSA in einer wässrigen Protein-Lösung. Dieser Wert beträgt etwa $-48,1$ Joule/g. Die Partialenthalpie $\partial \Delta H / \partial g(\text{RSA})$ drückt die Änderung von ΔH aus, wenn eine kleine Menge RSA in das Gemisch eingebracht wird, wobei alle übrigen Parameter konstant zu halten sind. Der negative Wert der Partialenthalpie weist darauf hin, daß das Lösungsmittel unter dem Einfluß starker Wechselwirkungskräfte des RSA steht. Durch diese Wechselwirkungskräfte wird ein relativ großer Anteil des Lösungsmittels kalorisch verändert, so daß keine Phasenübergänge mehr auftreten (siehe Abb. 12).

Der erste Hinweis auf eine gegenseitige Beeinflussung des RSA und des Lösungsmittels ist an

dem Verschwinden des Phasenübergangs des Eutektikums zu erkennen (siehe Abb. 9).

Erreicht der Proteinanteil im Gemisch einen Wert von 0,1, so wird die Ausbildung des für ein Salz typisches Eutektikum verhindert (siehe Abb. 10). Bei einer Wechselwirkung zwischen RSA und Wasser allein müßte das Schmelzverhalten des Eutektikums unverändert bleiben und nur entsprechend dem Lösungsmittelanteil abnehmen. Die Verbreiterung des Phasenüberganges (siehe Abb. 9) und die schnelle Abnahme der Schmelzenthalpie (siehe Abb. 10) des Eutektikums deuten jedoch darauf hin, daß alle drei Komponenten sich gegenseitig beeinflussen. Übersteigt der Proteinanteil im Gemisch einen Wert von 0,5, so durchläuft die Partialenthalpie einen Übergangsbereich und erreicht für trockenes Protein einen Wert von etwa 32,6 Joule/g, der mit dem Wert von trockenem Protein in dem System Protein-Wasser-Gemisch gut übereinstimmt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß in Protein-Wasser-Gemischen die RSA-Moleküle in hydratisierter Form vorliegen. Nach einer Modellvorstellung besteht die Hydrathülle aus einem relativ fest gebundenen Anteil des Wassers und einer temperaturabhängigen "Wasseratmosphäre", die sich an den festgebundenen Anteil des Wassers anschließt. Innerhalb dieser "Atmosphäre" befindet sich Wasser, das noch Phasenübergänge aufweist.

Eine Erweiterung dieses binären Gemisches durch Zusatz von Salz führt dazu, daß eine größere

Menge des Lösungsmittels unter den Einfluß der Wechselwirkungskräfte steht. Auch für dieses System ergibt sich - entsprechend einer Modellvorstellung - eine Menge des Lösungsmittels, das keinen Phasenübergang mehr aufweist und eine erweiterte "Atmosphäre", die noch unter dem Einfluß der Wechselwirkungskräfte steht.

In dem für das Zytoplasma interessierenden Konzentrationsbereich ist der Wert für die Partialenthalpie und für die partielle spezifische Wärme des Lösungsmittels unverändert gleich dem Wert des Lösungsmittels selbst. Die Partialenthalpie des RSA im Gemisch ist dagegen stark verändert gegenüber dem Wert des trockenen RSA und ist negativ. Die partielle spezifische Wärme des RSA ist merklich größer als die des trockenen Proteins.

Im unphysiologischen Konzentrationsbereich hochkonzentrierter Mischungen ist die Partialenthalpie des RSA praktisch unverändert, während die Partialenthalpie des Lösungsmittels stark verändert ist. Im Grenzfall des lösungsmittelfreien Gemisches ergibt sich die Partialenthalpie für das gebundene Lösungsmittel. Die partielle spezifische Wärme des RSA ist unverändert und gleich der des trockenen Proteins, während die partielle spezifische Wärme des Wassers in diesem Konzentrationsbereich größer ist als die spezifische Wärme des Wassers selbst.

In der folgenden Tabelle sind diese Ergebnisse noch einmal zusammengefaßt. Dabei ist für den Radius des RSA-Moleküls ein Wert von $27.5 \text{ \AA}$

angenommen und vorausgesetzt, daß die Hydrathüllen das Molekül kompakt umschließen. Die Dichte des "gebundenen" Lösungsmittels ist mit 1 angenommen.

$\Delta R/R$ ist die relative Dicke der Hydrathülle. Das "kalorisch gebundene" Wasser enthält nur Wasser ohne Phasenübergänge vom festen zum flüssigen Zustand, während die sogenannte "Wasseratmosphäre" auch Wasser enthält, das als Eis ausfriert. $\partial \Delta H / \partial g$ (Lsgm.) ist die Partialenthalpie des Lösungsmittels und $\partial \Delta H / \partial g$ (RSA) die Partialenthalpie des Rinderserumalbumins.

Der physiologische Konzentrationsbereich bezieht sich auf verdünnte Gemische, deren Wasseranteil den Wert von etwa 0,5 nicht unterschreiten. In den dickeren Gemischen wurde die Konzentration als unphysiologisch bezeichnet. $\partial C / \partial g$ (H_2O) ist die partielle spezifische Wärme des Wassers in einem Gemisch, dessen mittlere spezifische Wärme C ist. Die Bestimmung von C in Abhängigkeit vom Wasseranteil wurde bei $25^\circ C$ durchgeführt (siehe Abb. 15).

Tabelle 6

	Kalorisch gebun- denes Wasser β in g Lösungs- mittel pro g RSA	$\frac{\Delta R}{R}$	"Wasseratmos- phäre" β in g Lösungs- mittel pro g RSA	$\frac{\Delta R}{R}$
Wasser- Protein- Gemisch	0,29	0,11	0,54	0,20
Wasser- Protein- NaCl- Gemisch	0,54	0,20	0,92	0,35

	$\frac{\partial \Delta H}{\partial g(\text{Lsgm.})}$ in Joule/g	$\frac{\partial \Delta H}{\partial g(\text{RSA})}$	$\frac{\partial c}{\partial g(\text{H}_2\text{O})}$ in Joule/g und Grad	$\frac{\partial c}{\partial g(\text{RSA})}$
Wasser-Protein- Gemisch Konzentrationsbereich unphysiolog. physiolog.	424,6	-48,1	4,184	1,59
Wasser-Protein- Gemisch Konzentrationsbereich unphysiolog. physiolog.	142,3	33,4	5,73	1,07
Wasser-Protein-NaCl- Gemisch Konzentrationsbereich unphysiolog. physiolog.	384	-79,8		
Wasser-Protein-NaCl- Gemisch Konzentrationsbereich unphysiolog. physiolog.	160,1	32,6		

4. Untersuchungen der kalorischen Eigenschaften des Wassers in biologischen Zellen

4.10 Vorbemerkung

Bei der Anwendung der kalorischen Untersuchungsmethoden auf eine biologische Zelle darf nicht unbeachtet bleiben, daß das Zytoplasma ein recht kompliziertes System darstellt. Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, stellen Wasser und Protein zwar den größten Anteil am Zytoplasma dar, das System Zelle ist aber ein Vielkomponentensystem. Nun ist aber die Zelle mehr als nur die Summe ihrer Bestandteile, da diese Bestandteile miteinander in Wechselwirkung stehen. So ist z. B. nicht bekannt, wie die Anwesenheit der verschiedenen Salze oder die Membranen die kalorischen Eigenschaften beeinflussen.

Es ist daher keineswegs selbstverständlich, daß sich das kalorische Verhalten des Zytoplasmas einer Zelle auch nur annähernd durch das einfache Verhalten eines binären Protein-Wasser-Gemisches beschreiben läßt, dem noch etwas Salz hinzugemischt ist.

Die kalorischen Untersuchungen wurden an einer großen Anzahl gleichartiger Zellen durchgeführt und so ergeben sich auch hier - wie bei vielen zellphysiologischen und zellbiochemischen Untersuchungsmethoden - zusätzliche experimentelle Schwierigkeiten durch die Anwesenheit des Suspensionsmediums. Inwieweit dieser Einfluß der unterschiedlichen Suspensionsmedien durch geeignete Wahl der experimentellen Bedingungen eliminiert oder entsprechend klein gegenüber dem eigentlichen Meßeffect gehalten werden kann, hängt von dem jeweiligen Experiment ab.

Die ersten Messungen wurden an einfachen Zellen durchgeführt. Es waren menschliche Erythrozyten, da diese einen einfachen Bau aufweisen, ihre chemische Zusammensetzung bekannt ist und über den Wassertransport durch Membranen genügend Arbeiten vorliegen. Als Suspensionsmedien wurden Kochsalzlösungen oder Krebs-Ringer-Phosphat-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen verwendet. Beim Einfrieren der Zellen traten die bekannten Gefrierschäden auf, die bis zur völligen Zerstörung der Zellen führen können. Nach Zugabe von unterschiedlichen Mengen Glyzerin in das Suspensionsmedium als Gefrierschutzmittel wurden die kalorischen Eigenschaften des Zytoplasmas untersucht.

4.20 Vorbehandlung der biologischen Proben

4.21 Menschliche Erythrozyten in Kochsalzlösung und Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung unterschiedlicher Konzentration

Zwei Milliliter frisches menschliches Blut (Citratblut) wurden mit einer 0,9 %igen NaCl-Lösung (physiologische Kochsalzlösung) auf 40 ml aufgefüllt und mehrmals gewaschen. Danach wurde die Suspension in einer Kühlzentrifuge der Firma Christ bei 4000 U/min und bei einer Temperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ 20 min lang abzentrifugiert. Das Sediment wurde in Hämatokritröhrchen eingefüllt und in einer Ultrazentrifuge der Firma Beckman bei 26000 U/min (55000 g) und bei einer Temperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ etwa eine Stunde lang zentrifugiert. Dabei wurden die Erythrozyten so dicht gepackt, daß das Erythrozytensediment tief rot, klar und durchsichtig war. Der Extrazellularraum beträgt bei einer solchen Packung nur etwa 1 bis 3 Volumenprozent [45, 46, 47, 49, 52, 53, 60]. Der geringe Anteil der extrazellulären Flüssigkeit dürfte sich bei der Bestimmung der Enthalpiedifferenz der Erythrozyten nicht störend bemerkbar machen.

Das zähe Sediment wurde in kleine Aluminiumkapseln eingewogen und gasdicht mit einer Presse verschlossen. Die Masse der eingewogenen Sedimente betrug einige mg. In einem Alkoholbad von -72°C wurden die dichtgepackten Erythrozyten eingefroren und in einer Kühltruhe bei einer Temperatur von -30°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt [24].

Wurde das frische Spenderblut mit einer hypotonischen NaCl-Lösung vermischt, so begannen die Erythrozyten durch Wasseraufnahme zu schwellen. War hingegen das Außenmedium hypertonisch, so schrumpften die Erythrozyten, indem sie Wasser an das Außenmedium abgaben. So konnte nach geeigneter Wahl des Salzgehaltes des Außenmediums der Wassergehalt der Erythrozyten in einem weiten Bereich variiert werden. Die so vorbehandelten Erythrozyten wurden dicht gepackt und ebenfalls eingefroren.

Schließlich wurden Erythrozyten, nachdem sie gewaschen waren, durch Zugabe von destilliertem Wasser hämolysiert. Diese Gemische bestanden daher aus verdünntem Zytoplasma und Membranen.

Neben der Aufbereitung der Erythrozyten in Kochsalzlösungen wurden auch Krebs-Ringer-Phosphat (KRP)-Lösungen als Suspensionsmedien verwendet. Hierbei wurden durch Verdünnung der KRP-Lösungen mit Wasser hypotonische Lösungen hergestellt, in denen die Erythrozyten zu schwellen begannen. Durch Konzentrierung der KRP-Lösungen wurden hypertonische Lösungen erzeugt. Die weitere Verarbeitung der Erythrozyten erfolgte wie im Falle der NaCl-Lösungen als Suspensionsmedien.

Der Wassergehalt der Erythrozyten wurde durch Trockengewichtsbestimmung ermittelt. Dabei wurden die Proben bei einer Temperatur von $+108^{\circ}\text{C}$ etwa 20 Stunden lang getrocknet.

4.22 Menschliche Erythrozyten in Salzlösungen mit Glycerin als Gefrierschutz

Menschliches Blut wurde in KRP-Lösungen überführt, in der ein Teil des Wassers durch Glycerin ersetzt wurde. Die Erythrozyten befanden sich somit in einem Suspensionsmedium mit dem Salzgehalt einer physiologischen KRP-Lösung. Die Summe der Anteile aus Wasser und Glycerin war immer gleich.

In diesem Gemisch wurden die Erythrozyten 20 min lang bei Zimmertemperatur inkubiert. Während dieser Zeit konnte Glycerin auf die Zellen einwirken. Nach Untersuchungen von LOVELOCK [33] dringt bei Zimmertemperatur Glycerin innerhalb weniger Minuten durch die Erythrozytenmembran in die Zelle. Dabei wurden die Erythrozyten mehrmals in physiologischer Salzlösung gewaschen, bevor sie in das glyzerinhaltige Suspensionsmedium übergeführt wurden. Störend wirken sich jedoch Metallionen aus. Bereits ein Zusatz von 3×10^{-5} Mole Kupferionen setzen die Permeabilität des Glycerins durch die Erythrozytenmembran ganz erheblich herab. In Abb. 18 ist nach LOVELOCK [33] die Permeabilität von Glycerin durch die Erythrozytenmembran in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt.

Bei einer Temperatur von etwa $+20^{\circ}\text{C}$ hat das Glycerin bereits nach 2 min eine Gleichverteilung erreicht (siehe Abb. 18), während sich bei Anwesenheit von 3×10^{-5} Molen Kupferionen in der Suspension eine Gleichverteilung erst nach etwa 36 min einstellt. Bei Gleichverteilung des Glycerins beginnt die Hämolyse der Erythrozyten.

Nach etwa 20 min wurden die Erythrozytensuspensio-

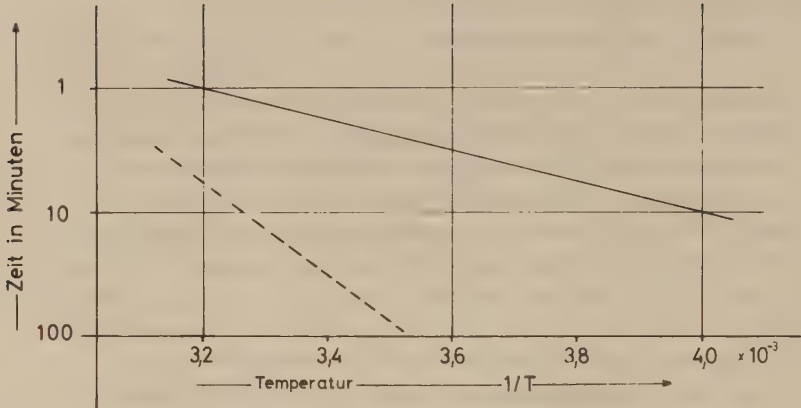


Abb. 18: Permeabilität von Glycerin durch die Erythrozytenmembran für verschiedene Temperaturen. Auf der Ordinate steht die Zeit in Minuten, nach der Hämolyse einsetzt. Auf der Abszisse ist der reziproke Wert der absoluten Temperatur aufgetragen. Die gestrichelte Kurve bezieht sich auf Zellsuspensionen, die 3×10^{-5} Mole Kupferionen enthalten. (Nach LOVELOCK [33]).

nen in einer Ultrazentrifuge bei 26000 U/min etwa eine Stunde lang zentrifugiert. Der Überstand war klar und ohne jede Färbung. Das dichtgepackte Sediment wurde in Probenschälchen zur weiteren Verarbeitung eingewogen. Der genaue Anteil des Wassers, den die Erythrozyten in solchen Gemischen noch besitzen, wurde durch eine Trockengewichtsbestimmung ermittelt. Dazu wurden die glyzerinhaltigen Proben bei einer Temperatur von $+108^{\circ}\text{C}$ etwa 20 Stunden lang getrocknet. Der Rückstand enthielt neben dem Trockenanteil noch das Glycerin, das bei dieser Temperatur noch nicht verdampft. Deshalb war der Rückstand nicht so hart und spröde wie bei den Erythrozytensedimenten, die in reiner Salzlösung suspendiert wurden.

4.30 Ergebnisse der kalorischen Untersuchungen an Erythrozyten

4.31 Kalorische Eigenschaften von gefrorenen Erythrozyten

Erythrozyten, die in einer physiologischen Kochsalzlösung suspendiert wurden, haben einen Wassergehalt von 0,61 g Wasser pro Gramm Erythrozyten. Der Wassergehalt der Erythrozyten stieg bei einer Salzkonzentration im Außenmedium von 0,0856 Mol pro l (0,5 %ige NaCl-Lösung) auf etwa 0,72 g pro Gramm Erythrozyten. Bei einer Salzkonzentration von 0,342 Mol pro l (2 %ige NaCl-Lösung) erreichte der Wassergehalt im Erythrozyten den Wert von 0,50 g pro Gramm Erythrozyten [24] .

Ersetzt man die einfache NaCl-Lösung durch KRP-Lösung und suspendiert darin die Erythrozyten, so ergeben sich ähnliche Werte für den Wassergehalt der Erythrozyten in Abhängigkeit vom Salzgehalt.

Zur Bestimmung der mittleren Enthalpiedifferenz der Mischung wurden Proben - dichtgepackter Erythrozyten mit unterschiedlichem Wassergehalt - im Temperaturbereich von -47°C bis 0°C im Kalorimeter ausgemessen. Der Verlauf der Schmelzkurven zeigt einen ähnlichen Verlauf wie bei den früher beschriebenen Schmelzkurven der Wasser-Protein-Mischungen (siehe Abb. 3). Über einen weiten Temperaturbereich ist dieser Schmelzprozeß ausgedehnt, der bei einer Temperatur von etwa -20°C einsetzt.

Auffallend ist an den Schmelzkurven der Erythrozytensedimente, daß im untersuchten Temperaturbereich von etwa -50°C bis 0°C kein Phasenübergang auftritt, der auf das Schmelzen einer eutektischen Mischung von Salz und Wasser hinweist. Alle untersuchten dicht gepackten Erythrozytensedimente enthielten genügend freies Wasser, so daß stets ausgeprägte Phasenumwandlungen auftraten. Eine Integration dieser Kurven unter Berücksichtigung der Anteile, die von den Aluminiumkapseln herrühren, in die die Sedimente eingeschlossen waren, ergibt die mittlere Enthalpiedifferenz.

In Abb. 19 ist die mittlere Enthalpiedifferenz der Erythrozytensedimente in Abhängigkeit vom Wasseranteil dargestellt.

Die eingezeichneten Meßpunkte ($\bullet$, $\circ$) sind die Ergebnisse der Untersuchungen an dichtgepackten Erythrozyten, die in Kochsalz- bzw. KRP-Lösungen unterschiedlicher Salz-Konzentration suspendiert waren. Die offenen Dreiecke (Δ) beschreiben das Verhalten von hämolysierten Erythrozyten bis schließlich nur noch reines Wasser vorliegt ($\square$). Durch diese Punkte wurde nach der Methode der kleinsten Quadrate eine Gerade berechnet, die in Abb. 19 eingezeichnet ist. Die Verlängerung dieser Geraden schneidet die Ordinate bei einem Wert von $-33,4$ Joule/g. Für den getrockneten Rückstand ergibt sich der auf der Ordinate eingezeichnete Punkt ($\blacksquare$) für $w = 0$.

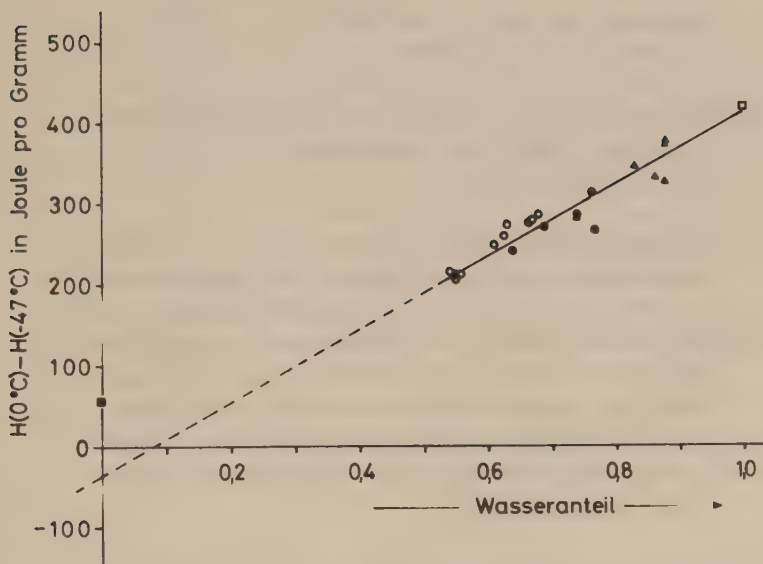


Abb. 19: Enthalpiezunahme des Erythrozytensediments zwischen -47°C und 0°C in Joule/g(Sediment) in Abhängigkeit vom Gewichtsanteil des Wassers w im Sediment. $w = g(\text{H}_2\text{O})/g(\text{Sediment})$. Die Erythrozyten wurden in Kochsalzlösung (○) und in KRP-Lösung (●) suspendiert. In wässriger KRP-Lösung wurden Erythrozyten hämolysiert (Δ). Das Ergebnis der Messung an getrockneten Erythrozyten ist durch (■) dargestellt. (□) bezieht sich auf reines Wasser.

Überführt man das Erythrozytensediment nach einiger Zeit wieder in eine physiologische Salzlösung, nachdem das Sediment eingefroren war, so sind in der Suspensionslösung nur noch zerstörte Erythrozyten aufzufinden. Wird dagegen das Erythrozytensediment nicht eingefroren, so sind bei einer mikroskopischen Beobachtung im

Suspensionsmedium ausschließlich unverletzte Erythrozyten zu erkennen.

4.32 Kalorische Eigenschaften von gefrorenen Erythrozyten nach Zugabe von Gefrierschutzmittel in das Suspensionsmedium

Der Zusatz eines Gefrierschutzmittels zu einer physiologischen Salzlösung, in der Erythrozyten suspendiert werden, bewahrt die Erythrozyten im allgemeinen nach einer Kältebehandlung vor einer Hämolyse. Als Suspensionsmedium wurde eine KRP-Lösung mit Glyzerinzusatz verwendet. Die kalorischen Eigenschaften dieser KRP-Lösung mit Glyzerinzusatz wurden zuerst ohne Zugabe von Erythrozyten untersucht.

Proben von einigen mg wurden in Aluminiumkapseln eingewogen und im Kalorimeter die mittlere Enthalpiedifferenz der Mischung gemessen. In Abb. 20 sind die Schmelzkurven von KRP-Lösungen mit unterschiedlichem Glyzerinzusatz dargestellt.

Die Schmelzkurven für eine reine KRP-Lösung zeigt ein ausgeprägtes Schmelzmaximum bei einer Temperatur von 0°C . In dem hier untersuchten Temperaturbereich tritt kein Maximum auf, das einem eutektischen Gemisch zugeordnet werden kann.

Mit zunehmendem Glyzeringehalt nimmt das Maximum der Schmelzenthalpie ab und wandert zu tieferen Temperaturen. Der Phasenübergang vom festen zum flüssigen Zustand ist stark von dem Anteil des Glyzerins im Gemisch abhängig und kann für einen Glyzerinanteil von mehr als 50 % nicht mehr

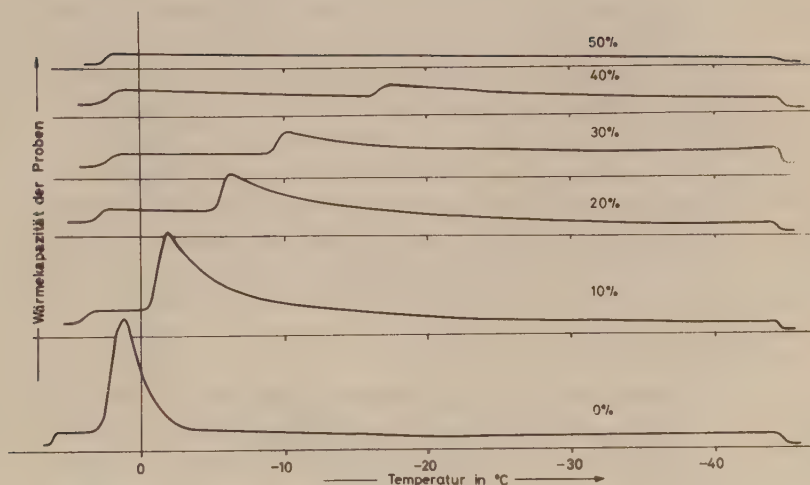


Abb. 20: Schmelzkurven von KRP-Lösung-Glyzerin-Gemischen. Auf der Abszisse ist die Temperatur aufgetragen und auf der Ordinate die Wärmekapazität der Proben. Als Parameter ist der Glyzerinanteil angegeben. 0 % bedeutet reine KRP-Lösung. 20 % bedeutet, daß in der KRP-Lösung 20 % des Wasseranteils durch Glyzerin ersetzt sind.

nachgewiesen werden. In einem solchen Gemisch tritt mit abnehmender Temperatur eine Erstarrung ein ähnlich wie bei einer Glasschmelze. Die dazu erforderliche Wärmemenge erhält man durch Integration der in Abb. 20 dargestellten Schmelzkurven im Temperaturbereich von -47°C bis 0°C .

In Abb. 21 ist die mittlere Enthalpiedifferenz der Mischung in Abhängigkeit von dem Anteil w_1 der KRP-Lösung aufgetragen. Hierbei ist $w_1 = g(\text{H}_2\text{O} + \text{Salz}) / g(\text{H}_2\text{O} + \text{Salz} + \text{Glyzerin})$ und $g(\text{Salz})$ konstant.

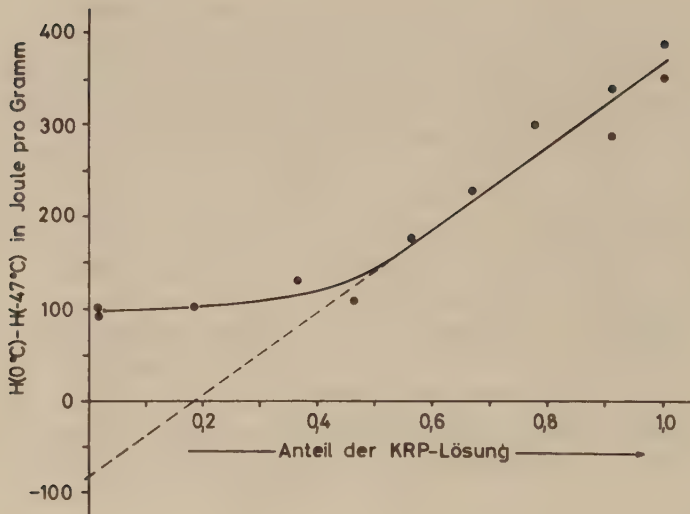


Abb. 21: Mittlere Enthalpiedifferenz eines Glyzerin-Wasser-Salz-Gemisches.
 Auf der Ordinate ist die mittlere Enthalpiedifferenz in Joule/g aufgetragen und auf der Abszisse der Anteil w_1 der Salzlösung.
 $w_1 = 0$ bedeutet reines Glyzerin und $w_1 = 1$ reine physiologische KRP-Lösung.
 $w_1 = 0,5$ bedeutet, daß 0,5 Teile des Wassers in der KRP-Lösung durch Glyzerin ersetzt sind.

Das Gemisch besteht also aus einer KRP-Lösung, bei der ein Teil des Wassers durch Glyzerin ersetzt ist. Der Verlauf der Kurve läßt sich in zwei Bereiche unterteilen. Bei Mischungen mit wenig Glyzeringehalt können die Meßpunkte durch eine Gerade angenähert werden. In diesem Konzentrationsbereich der Mischungen sind noch ausgeprägte Phasenübergänge nachweisbar. Mit zunehmendem Anteil des Glyzerins im Gemisch nehmen

die Kurven einen flacheren Verlauf. Im Experiment können keine Phasenübergänge mehr gemessen werden (siehe Abb. 20). Durch den Schnittpunkt mit der Geraden durch den Punkt $w_1 = 0$ mit der Anfangssteigung der Meßkurve und linear ansteigenden Teil der Kurve wird ein Anteil der Flüssigkeit definiert, für den kein Phasenübergang in Form eines ausgeprägten Schmelzprozesses mehr nachgewiesen werden kann. Der Schnittpunkt der beiden Geraden ergibt einen Wert von etwa 0,42 g Salzlösung pro Gramm Gemisch.

Nach der Theorie binärer Gemische kann nach Gleichung (11) eine Aussage über eine Kombination der Partialenthalpien von Glycerin und Salz oder von Wasser und Salz gewonnen werden, wenn man den Molenbruch des Salzes gegenüber den Molenbrüchen der flüssigen Komponenten vernachlässigt. Mit dieser Annahme ergibt sich für die Partialenthalpie des Glycerins in einer wässrigen Salzlösung ein Wert von -85 Joule/g. Dieser Wert enthält jedoch noch einen kleinen Beitrag, der von der Salzkomponente herrührt.

Für das Wasser in diesem wässrigen Gemisch ergibt sich ein Wert für die Partialenthalpie von etwa 370 Joule/g. Dieser Wert enthält ebenfalls noch den Beitrag der Salzkomponente.

In diesem Medium wurden nun Erythrozyten suspendiert. Friert man solche Suspensionen ein, so zeigt nach dem Auftauen eine mikroskopische Beobachtung, daß mit zunehmendem Glycerinanteil die Zahl der unversehrten Erythrozyten zunimmt. Bei einem Glycerinanteil von etwa 30 % sind im

Mikroskop ausschließlich unzerstörte Erythrozyten zu erkennen. Werden die Erythrozyten zu lange der Einwirkung des Glycerins ausgesetzt, so tritt vorzeitig Hämolyse ein.

Bestimmt man die mittlere Enthalpiedifferenz der Erythrozytensedimente, die in glyzerinhaltigen Lösungen suspendiert waren, so ergibt sich der in Abb. 22 dargestellte Verlauf.

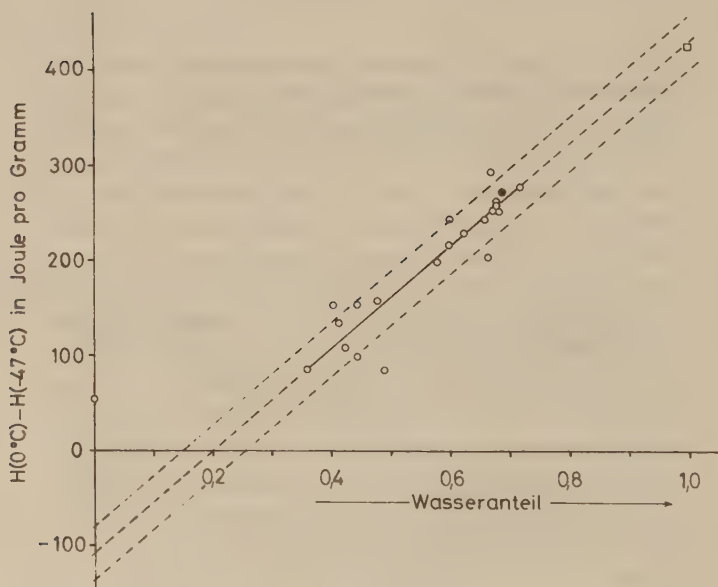


Abb. 22: Mittlere Enthalpiedifferenz in Joule/g von Erythrozytensedimenten, die in glyzerinhaltigen Lösungen suspendiert waren. Auf der Abszisse ist der Wassergehalt w der Proben aufgetragen. $w = g(\text{H}_2\text{O})/g(\text{Sediment})$. $\circ$ in glyzerinhaltiger Salzlösung; $\bullet$ in physiologischer KRP-Lösung suspendierte Erythrozyten; $\square$ Wasserwert. Für $w = 0$ ist der Wert für getrocknete Erythrozyten eingetragen.

Durch die Meßpunkte wurde nach der Methode der kleinsten Quadrate eine Gerade berechnet und über den Meßbereich von $0,36 \leq w \leq 0,72$ hinaus extrapoliert. Für $w = 1$ schneidet die Gerade den eingezeichneten Wert für reines Wasser ($\square$). Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate für $w = 0$ ergibt einen Wert von etwa -106 Joule/g.

Welche Aussagen diese Ergebnisse über das kalorische Verhalten des Wassers in den behandelten biologischen Zellen zulassen, wird im folgenden diskutiert.

4.40 Diskussion der Ergebnisse der Untersuchungen an biologischen Zellen

4.41 Kalorische Eigenschaften von gefrorenen Erythrozyten in Salzlösungen

4.41a Vorbemerkungen

Es liegt nahe, nach den früher durchgeführten Versuchen mit Protein-Wasser-Gemischen, die Erythrozytensedimente mit unterschiedlichem Wassergehalt in analoger Weise zu analysieren.

Das Erythrozytensediment besteht in erster Linie aus Wasser und Protein. Im normalen Zustand enthalten die Erythrozyten des Menschen, nach Angaben aus der Literatur [54, 63] 61,6 Gewichtsprozent Wasser, 36,8 % Protein - davon sind 90 % Hämoglobin -, 0,1 % Ribonukleinsäure, 0,6 % Lipide, 0,2 % andere organische Substanzen und 0,78 % Salze.

Eine sinnvolle Interpretation der Meßwerte in Abb. 19 setzt voraus, daß die verschiedenen Sedimente praktisch nur aus Erythrozyten bestehen und daß sich die Erythrozyten nur in ihrem Wassergehalt unterscheiden.

Durch eine dichte Packung der Erythrozyten in einer Ultrazentrifuge wird erreicht, daß mit hinreichender Genauigkeit die Sedimente praktisch keine Zwischenvolumina mehr haben und somit das Sediment nur Erythrozyten enthält.

4.41b Osmotischer Wassertransport

Erythrozyten, die in einer physiologischen Salzlösung suspendiert werden, verlieren nur sehr langsam Kalium im Austausch gegen Natrium [48, 53]. Beim osmotischen Wassertransport, der in einer hypertonen Salzlösung zur Volumenabnahme und in einer hypotonischen Salzlösung zur Volumenzunahme der Erythrozyten führt, finden jedoch Elektrolytverschiebungen in verstärktem Maße statt.

SOLOMON et al. [15] konnten zeigen, daß wegen der Abhängigkeit der elektrischen Ladung des Hämoglobins von seiner Konzentration im Zytoplasma systematische Elektrolytverschiebungen bei osmotischen Volumenänderungen zu messen sind. Der Elektrolytgehalt des Erythrozytenplasmas kann sich danach um etwa 10 % ändern.

Eigene Untersuchungen an Rindererythrozyten haben ebenfalls gezeigt, daß beim osmotischen Wassertransport merkliche Elektrolytverschiebungen auftreten. Bei einer Änderung des Salzgehaltes im Suspensionsmedium von 150 mMol/l Natrium auf etwa 290 mMol/l Natrium bzw. von 5 mMol/l Kalium auf etwa 11 mMol/l Kalium nimmt der Natriumgehalt im Erythrozyten um etwa 25 % und der Kaliumgehalt um etwa 40 % zu.

Die Ergebnisse der kalorischen Untersuchungen an Protein-Salz-Wasser-Mischungen (siehe Seite 30) lassen jedoch erwarten, daß die geringe Salzkonzentration im Zytoplasma einer Zelle die Menge des "kalorisch gebundenen" Wassers nur wenig beeinflußt. Ist weiterhin dieser geringe

Einfluß des Salzes durch osmotische Wasserverschiebungen um einige 10 % verändert, so sollte die Menge des "kalorisch gebundenen" Wassers davon kaum verändert werden.

4.41c Ausfrieren des Zellwassers

Die Bestimmung der mittleren Enthalpiedifferenz beruht auf der Annahme, daß bei den verschiedenen Sedimenten mit gleichem Wassergehalt die gefrorene und nichtgefrorene Mischung die gleiche 'Struktur' besitzt. Unter 'Struktur' sei hier in erster Linie die Menge des intrazellulären und extrazellulären ausgefrorenen Wassers und die Größe und Verteilung der Eiskristalle verstanden.

MAZUR [35, 36, 37, 38] , LOVELOCK [34] und ASAHINA et al. [3] haben an Erythrozyten und an anderen tierischen und pflanzlichen Zellen ausführlich die Verteilung des Wassers zwischen Zytoplasma und extrazellulärem Raum untersucht. MAZUR zeigte, daß in biologischen Systemen das intrazelluläre Wasser beim langsamen Einfrieren unterkühlt wird und nicht einfriert aufgrund der fehlenden Kristallkeime.

Die resultierende Dampfdruckdifferenz zwischen dem extrazellulären Eis und dem intrazellulären Zytoplasma führt dazu, daß Wasser die Zelle verläßt. Die Zelle wird dehydriert. Mit zunehmender Konzentration des Salzes im Zytoplasma verringert sich die Dampfdruckdifferenz, so daß der Ausstrom des Wassers langsam abnimmt. Eine zu hohe Salzkonzentration im Zytoplasma führt nach LOVELOCK [33] aber zur Schädigung der Zelle

ebenso wie die bei tiefen Temperaturen einsetzende Bildung von intrazellulären Eiskristallen.

Wird dagegen das Zytoplasma schnell eingefroren, so liegt eine ganz andere Verteilung des Wassers vor. Die Zeit für einen Wassertransport durch die Zellmembran ist zu kurz. Das Zellwasser friert in Form sehr kleiner Eiskristalle in der Zelle aus. Bei Abkühlungsgeschwindigkeiten, die $5000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ überschreiten, tritt Wasser schneller durch die Zellmembran als es nach der Permeabilität zu erwarten wäre. Unter diesen Bedingungen erfolgt entweder eine Zerstörung der ganzen Membran oder es bilden sich zahlreiche kleine Löcher in der Membran. Letzteres wurde bei Erythrozyten festgestellt, die mit einer höheren Geschwindigkeit als $5000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ abgekühlt wurden [38] .

Daraus folgt, daß es eine optimale Abkühlungsgeschwindigkeit gibt, bei der möglichst wenige Erythrozyten zerstört werden. Die Abkühlungsgeschwindigkeit muß hoch genug sein, um die Dehydration möglichst klein zu halten aber andererseits langsam genug, um eine Membranzerstörung zu vermeiden.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen dürfte die Abkühlungsgeschwindigkeit einen Wert von $3000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ nicht überschritten haben. Es werden daher Dehydration als auch intrazelluläre Eisbildung auftreten.

Entsprechende Überlegungen treffen auch auf den Erwärmungsprozeß zu. Beim Erwärmen ist eine

lange Zeit erforderlich, um alles Eis aufzutauen. Unter diesen Bedingungen können ebenfalls Dampfdruckdifferenzen auftreten, die zu Wasserverschiebungen führen. Beim langsamen Auftauen - wie es im Kalorimeter erfolgt - werden die kleinen Eiskristalle zu großen intrazellulären Eiskristallen verschmelzen und Wasserverschiebungen werden in der zum Einfrieren umgekehrten Richtung auftreten. Diese teilweise reversible Wasserverschiebung dürfte auch dafür verantwortlich sein, daß die in der Histologie übliche Gefrierschnittsmethode histologische Präparate guter Qualität liefert. Allerdings werden hierbei auch irreversible Änderungen der zytoplasmatischen Membranen vorliegen. Auf diese Schädigung deutet die Beobachtung hin, daß die im Kalorimeter aufgetauten Erythrozyten beim Suspensieren in physiologischer Salzlösung hämolysieren.

4.41d Interpretation der Meßergebnisse

Der hier gemessene Betrag der Wärme, der aufzuwenden ist, um gefrorene Erythrozyten von einer Temperatur von -47°C auf die Temperatur von 0°C zu erwärmen und zu schmelzen, wird zum überwiegenden Teil zum Schmelzen des Wassers benötigt. Dabei tritt kein Phasenübergang auf, der auf das Schmelzen einer eutektischen Mischung von Salz und Wasser hindeutet. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit den Daten von ANDRONIKASHVILI et al. [2] und MREVLISHVILI und Mitarbeiter [44], die bei ihren Messungen an gefrorenen Geweben und makromolekularen Lösungen ein ähnliches Verhalten der Funktion

dH/dT gefunden haben. Auch die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen von Protein-Salz-Wasser-Mischungen haben gezeigt, daß bei den im Zytoplasma vorliegenden Konzentrationen der anorganischen Salze keine Phasenumwandlung zu erwarten ist, die einem Eutektikum zugeordnet werden kann.

Innerhalb der hier vorliegenden Meßgenauigkeit läßt sich jedoch keine Aussage darüber machen, ob beim Einfrieren der Proben vor der Messung Wasserverschiebungen zwischen Zytoplasma und dem extrazellulären Raum stattgefunden haben oder ob solche im Kalorimeter auftreten, da diese Wasserverschiebungen wohl nur mit einer geringen Wärmetönung verbunden sind. Damit ist es im Hinblick auf die Meßgenauigkeit, die hier erreicht wurde, gleichgültig, ob ein Teil des Wassers außerhalb der Zelle ausfriert.

Setzt man nun voraus, daß bei den osmotischen Volumenveränderungen praktisch nur Wasser durch die Zellmembran transportiert wird, was nach den oben gemachten Ausführungen nur näherungsweise der Fall ist, dann kann man das Erythrozytensediment als eine Art 'pseudobinäre Mischung', deren Variablen die Zahl der Wassermole und der Trockensubstanz sind. Die Darstellung der mittleren Enthalpiedifferenz in Abhängigkeit vom Wassergehalt des Erythrozytensediments in Abb. 19 ist schon unter der Annahme gemacht worden, daß in erster Näherung eine thermodynamische Analyse durchgeführt werden kann. Die Meßpunkte beginnen bei wasserarmen Sedimenten und führen über wasserreiche Sedimente und hämolysierte Erythrozyten kontinuierlich bis zu reinem

Wasser. Durch die Meßpunkte wurde eine Gerade nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet und in die Abb. 19 eingetragen.

Abb. 23 enthält neben dieser Geraden noch eine punktierte Kurve. Diese Kurve ist das Ergebnis der Messungen an Protein-Wasser-Gemischen (siehe Abb. 6).

Im Bereich wässriger Proben sind im Rahmen der vorliegenden Meßgenauigkeit beide Kurven gleich. Die Partialenthalpie des Wassers im Erythrozytensediment ist gleich der Enthalpiedifferenz des freien Wassers. Sie beträgt 424,6 Joule/g. Dieses Ergebnis sagt aus, daß die Zugabe von Wasser in das Zytoplasma, dessen Wasseranteil z. B. 0,7 beträgt, dieses zusätzliche Wasser sich wie freies Wasser verhält. Es zeigt das kalorische Verhalten des freien Wassers und ist nicht gebunden.

In diesem Bereich der wässrigen Gemische lassen sich die Eigenschaften von Erythrozytensedimenten in erster Näherung durch das Verhalten einer binären Protein-Wasser-Mischung beschreiben. Das trifft im besonderen auf den Zustand des Wassers zu. Und so kann - wenn auch mit gewissem Vorbehalt - daraus geschlossen werden, daß ähnlich wie in einer RSA-Wassermischung etwa 0,3 g Wasser pro Gramm Protein "kalorisch gebunden" wird.

Das bedeutet für den Zustand des Wassers in einem Erythrozyten, daß etwa 80 % des gesamten Zellwassers sich wie freies Wasser verhält.

Zellen, deren Proteinanteil im Zytoplasma geringer ist, haben einen entsprechend höheren Anteil des freien Wassers. In einer 'Durchschnittszelle' (siehe Tabelle 1) liegen daher mehr als 90 % des Zellwassers im freien Zustand vor. Nur ein geringer Prozentsatz ist "kalorisch gebunden".

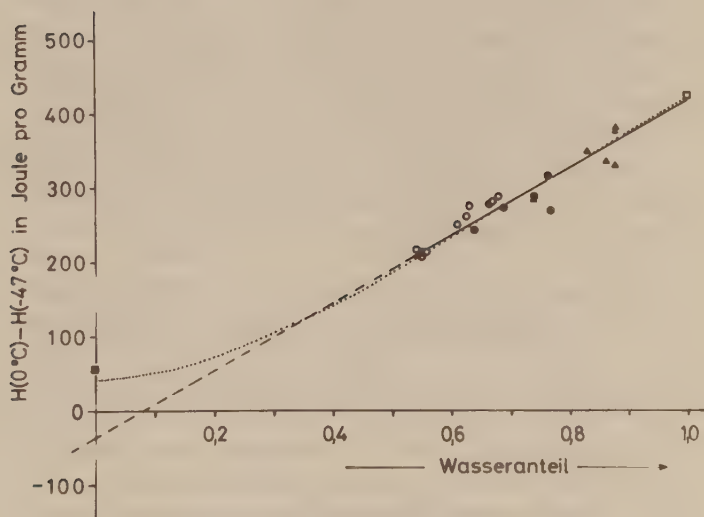


Abb. 23: Änderung der mittleren Enthalpiedifferenz in Abhängigkeit vom Wassergehalt für RSA-Wasser-Gemische (.....) und für Erythrozytensedimente (durchgezogene Gerade); (Weiteres siehe Text).

Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit ähnlichen Schlüssen [63], die z. B. aus Messungen des osmotischen Verhaltens von Erythrozyten [55, 64], aus Messungen der elektrischen Leitfähigkeit und Dielektrizitätskonstanten von

Erythrozytenplasma [48] und aus Messungen der Diffusion von kleinen Molekülen im Zytoplasma verschiedener Zellen gezogen werden.

Nach Gleichung (8) kann neben der Partialenthalpie des Wassers noch die Partialenthalpie des gesamten Trockenanteils bestimmt werden. Dieser Wert kann durch Extrapolation der eingezeichneten Geraden - nach Vorschrift von Gleichung (14) - gewonnen werden. Er ist negativ und hat einen Wert von etwa $-33,4$ % Joule/g. Dieser Wert liegt nahe der Partialenthalpie des RSA in wässrigen Gemischen und enthält die Beiträge aller löslichen und nichtlöslichen Rückstände des Trockenanteils. Eine weitere Auftrennung ist aufgrund der vorliegenden Meßergebnisse nicht möglich.

4.42 Kalorische Eigenschaften von gefrorenen Erythrozyten in Salzlösungen mit Gefrierschutzzusatz

4.42a Eigenschaften des Gefrierschutzmittels Glycerin

Aus dem vorher Gesagten folgt, daß beim langsamen Einfrieren von Zellsuspensionen die Zellen hauptsächlich durch Dehydration zerstört werden. Die eigentliche Ursache der Dehydration ist die Dampfdruckdifferenz zwischen dem extrazellulären und dem intrazellulären Raum. Diese Dampfdruckdifferenz kann man jedoch dadurch verkleinern, indem entweder der Dampfdruck der intrazellulären Flüssigkeit erniedrigt oder der Dampfdruck im extrazellulären Raum erhöht wird.

Eine brauchbare Schutzsubstanz sollte daher Wasser am Ausfrieren hindern, sollte Lösungs-

mittel für Elektrolyte sein, die Zellmembran ungehindert durchdringen können und auch in hoher Konzentration nicht toxisch sein. Dringt die Substanz in die Zelle ein, so muß sie ebenfalls die Zelle wieder verlassen können.

LOVELOCK [33] hat in einem klassischen Experiment versucht zu zeigen, daß Glyzerin in das Zellinnere eindringt und ein gutes Gefrierschutzmittel ist. Am Beispiel der Erythrozyten konnte LOVELOCK zeigen, daß die Zahl der überlebenden Erythrozyten von 97 % auf 67 % absinkt, wenn das Eindringen des Glyzerins durch die Zellmembran durch die Anwesenheit von Kupferionen verhindert wird. Die Einfrieretemperatur betrug hierbei -80°C und das Suspensionsmedium enthielt etwa 23 % Glyzerin. Zugleich zeigt das Experiment, daß allein die Anwesenheit des Glyzerins im Suspensionsmedium einen merklichen Gefrierschutz ausübt. Etwa 67 % der Erythrozyten überleben, während ohne Glyzerinzusatz nur etwa 2 % überlebende Erythrozyten zu erwarten sind.

MORRIS und FARRANT [43] haben Untersuchungen darüber angestellt, wie groß die Zahl der überlebenden Erythrozyten ist, die in glyzerinhaltigen Lösungen eingefroren wurden. In Abb. 24 ist der Prozentsatz der überlebenden Erythrozyten in Abhängigkeit von der Einfriereschwindigkeit dargestellt.

Erst wenn der Glyzerinanteil in der Salzlösung einen Wert von 0,3 erreicht, überleben etwa 90 % der Erythrozyten unabhängig von der Einfriereschwindigkeit. Bei einem geringeren

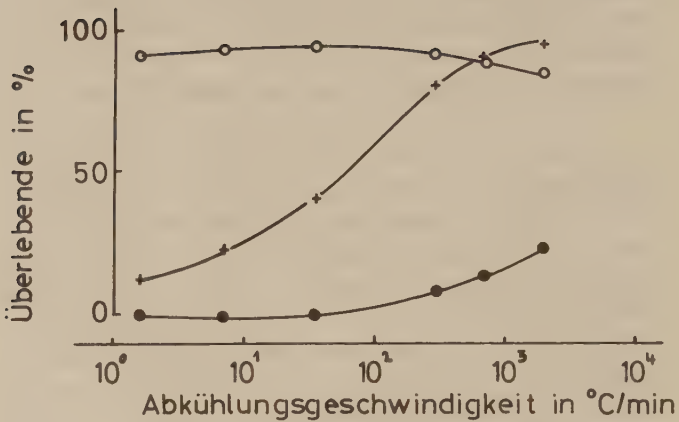


Abb. 24: Überlebende Erythrozyten, die auf -196°C abgekühlt wurden. Auf der Abszisse ist die Abkühlungsgeschwindigkeit in Grad Celsius pro Minute aufgetragen. Die Erythrozyten waren in folgenden glyzerinhaltigen physiologischen Lösungen suspendiert: ● ohne Glyzerinzusatz; +++ 10 % Glyzerinzusatz; ○ 30 % Glyzerinzusatz.

Glyzerinzusatz hängt die Zahl der überlebenden Erythrozyten stark von der Abkühlungsgeschwindigkeit ab.

Hochmolekulare Substanzen, die nicht in die Zelle eindringen können, sind durchaus als Gefrierschutzmittel geeignet. Über den Mechanismus dieser Gefrierschutzmittel ist jedoch wenig bekannt [40] .

Wässrige Glyzerinlösungen haben besonders in

der Kälte eine hohe Viskosität. Solche Gemische erstarren mit abnehmender Temperatur ähnlich wie Glas. Glasschmelzen befinden sich aber nicht im thermodynamischen Gleichgewicht bezüglich der Anordnung der Moleküle. Der Dampfdruck solcher Systeme ist größer als der von Systemen in kristallisierter Form, die im thermodynamischen Gleichgewicht sind.

Nach Untersuchungen von LITVAN [32] hat eine Glycerin-Wasser-Mischung mit einem Anteil von 45 Volumenprozent Glycerin keinen ausgeprägten Phasenübergang mehr, sondern erstarrt ähnlich wie eine Glasschmelze. In Abb. 20 sind die Ergebnisse eigener Experimente dargestellt, die die Untersuchungen von LITVAN bestätigen. Nach dem Tangentenschnittpunktverfahren (siehe Seite 29 und Seite 39) ergibt sich aus Abb. 21, daß bei einem Gewichtsanteil von etwa 0,58 Glycerin in einer wässrigen, salzhaltigen Lösung kein Phasenübergang vom festen in den flüssigen Zustand mehr nachzuweisen ist. Da die Dichte des Glycerins größer ist als die des Wassers, entsprechen 0,58 Gewichtsanteile etwa 47 Volumenprozent Glycerin. In dem glyzerinhaltigen Wasser-Salz-Gemisch wird also eine erhebliche Menge Wasser "kalorisch" verändert. Bezogen auf reines Glycerin ergibt sich ein Wert von etwa 0,72 Gramm Lösungsmittel pro Gramm Glycerin.

Entsprechend den experimentellen Voraussetzungen und unter Berücksichtigung der auf Seite 85 gemachten Näherungen ist - nach Gleichung (11) - in diesem Gemisch nur eine Kombination der

Partialenthalpien aus Glyzerin und Salz bzw. Wasser und Salz möglich. Die Partialenthalpie für Salz und Wasser in einem wässrigen Gemisch beträgt etwa 370 Joule/g. Dieser Wert liegt im Fehlerbereich der Partialenthalpie des Lösungsmittels in wässrigen Salz-RSA-Gemischen. Er beträgt 384 Joule/g (siehe Tabelle 6). Für die Partialenthalpie der Glyzerin-Salz-Komponente - entsprechend Gleichung (11) - ergibt sich näherungsweise ein Wert von etwa -85 Joule/g. Der negative Wert kommt dadurch zustande, daß bei Zugabe von Glyzerin und Salz in das Gemisch ein großer Anteil des Lösungsmittels am Ausfrieren gehindert wird. Der damit verbundene Verlust der Schmelzenthalpie ist weit größer als der gesamte Enthalpiegewinn durch die neu hinzukommende Substanzmenge.

WALLACH und Mitarbeiter [68] haben Erythrozyten in glyzerinhaltigen Lösungen eingefroren und bei einer Temperatur von -80°C bis -120°C bis zu 32 Monate lang gelagert. Danach haben die Autoren die Zellen vom Glyzerin abgetrennt und die Erythrozyten untersucht. Sie fanden eine geringe Zunahme des Na^{+} - und Cl^{-} -Gehaltes, während der K^{+} - und PO_4^{---} -Gehalt unverändert waren, ebenso wie die Kalium- und Natriumfluxe. Durch die lange Lagerung der Erythrozyten in glyzerinhaltigen Suspensionen bei tiefen Temperaturen wurde der aktive Transportmechanismus, der für eine bestimmte Elektrolytverteilung verantwortlich ist, nicht signifikant geschädigt.

Nach den oben beschriebenen Versuchen können Erythrozyten in glyzerinhaltigen Gemischen bei

tieften Temperaturen aufbewahrt werden. Werden sie danach aufgetaut und vom Glyzerin abgetrennt, so sind sie weitgehend intakt und z. B. für Transfusionen geeignet.

4.42b Osmotische Veränderungen

Eine sinnvolle Interpretation der Meßergebnisse nach der Theorie der Mischungen setzt voraus, daß die Anteile von Wasser, Glyzerin, von den Salzen und von den übrigen Stoffen in der Zelle bekannt sind. Eine Analyse nach der Theorie binärer Gemische setzt sogar voraus, daß sich nur die Anteile von Wasser und Glyzerin im intrazellulären Raum ändern, während alle übrigen Anteile unverändert bleiben.

Wie schon weiter oben ausgeführt wurde, besteht das Sediment praktisch nur aus Erythrozyten, da durch das Zentrifugieren in einer Ultrazentrifuge eine entsprechend hohe Packung der Erythrozyten erreicht werden kann (siehe Seite 75).

Nach Untersuchungen von LOVELOCK [33] dringt Glyzerin bei Zimmertemperatur sehr rasch in die Erythrozyten ein und führt in kurzer Zeit zur Hämolyse. Bei niedrigen Temperaturen - bei etwa $+4^{\circ}\text{C}$ - tritt Glyzerin relativ langsam durch die Zellmembran (siehe Abb. 18).

Eigene Untersuchungen an Rindererythrozyten bei einer Temperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ haben gezeigt, daß mit zunehmenden Anteil des Glyzerins im Suspensionsmedium der Wassergehalt im Erythrozyten abnimmt. Zugleich treten aber erhebliche Elektrolytverschiebungen auf. Bei einem Glyzerinanteil

von 10 % im Suspensionsmedium ist im Erythrozyten der Natriumgehalt etwa um 90 % und der Kaliumgehalt etwa um 65 % gegenüber dem Normalgehalt erhöht. Mit zunehmenden Anteil des Glyzerins im Suspensionsmedium ändert sich der hohe Natriumgehalt nur wenig, während der Kaliumgehalt relativ schnell auf seinen Normalwert absinkt. Beträgt der Glyzeringehalt im Suspensionsmedium 40 %, so ist der Natriumgehalt noch um etwa 70 % erhöht und der Kaliumgehalt praktisch unverändert.

Diese Ergebnisse machen deutlich, daß die Einwirkung von Glyzerin auf Erythrozyten nicht nur zu einem Transport von Wasser führt, sondern auch die Elektrolytverteilung in starkem Maße verändert.

4.42c Die mittlere Enthalpiedifferenz von gefrorenen, glyzerinhaltigen Erythrozytensedimenten

An diesem Beispiel der Erythrozyten, die in glyzerinhaltigen Salzlösungen suspendiert wurden, ist zu sehen, daß zwar die in Abb. 22 gewählte Darstellung der mittleren Enthalpiedifferenz eine Abhängigkeit vom Wassergehalt in der Zelle erkennen läßt, daß aber die Voraussetzungen für eine Analyse zur Bestimmung der Partialgrößen nicht mehr erfüllt sind. Das dem Experiment zugrunde liegende System hat zu viele Veränderliche. Zwischen den Zellproteinen, Salzen, Glyzerin und Wasser treten Wechselwirkungen auf, die erst an einfachen Modellsystemen untersucht werden müssen. Durch eine Erweiterung dieser einfachen Modellsysteme durch Zugabe weiterer Stoffe kann dann das kalorische Ver-

halten der einzelnen Komponenten im Gemisch untersucht werden.

In Abb. 22 ist in erster Näherung eine Gerade durch die stark streuenden Meßpunkte gelegt. Die beiden gestrichelten Parallelen sind ein Maß für die mittlere Abweichung der Meßpunkte von der durchgezogenen Geraden und lassen erkennen, daß keine hohe Meßgenauigkeit vorliegt. Es ist daher mehr als Zufall anzusehen, daß eine Extrapolation der durchgezogenen Geraden für den Wasseranteil $w = 1$ genau den Wert der Enthalpiedifferenz des reinen Wassers annimmt (siehe Abb. 22).

Der Zusatz von Glyzerin in das Suspensionsmedium führt zu einer merklichen Erniedrigung der mittleren Enthalpiedifferenz gegenüber der mittleren Enthalpiedifferenz der Erythrozytensedimente, die nur in salzhaltigen Lösungen suspendiert wurden. Trotz der Dichten der Erythrozyten in einer Ultrazentrifuge ist nicht auszuschließen, daß durch die Anwesenheit des Glyzerins zwischen den Zellen der erzielte Gefrierschutz der Erythrozyten zustande kommt. Solche Zellsedimente weisen beim Einfrieren im Temperaturbereich von 0°C bei etwa -50°C keine Phasenübergänge vom festen in den flüssigen Zustand mehr auf, die mit zur Schädigung der Erythrozyten führen. Das Zellsediment erstarrt mit abnehmender Temperatur wie eine Glasschmelze.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit ist ein Beitrag zum Verständnis des kalorischen Verhaltens der Zellkomponenten beim Einfrieren von Zellen.

Erste Untersuchungen wurden an Modellsystemen - an Protein-Wasser-Gemischen und an Protein-Kochsalz-Wasser-Gemischen - im Temperaturbereich von -47°C bis 0°C durchgeführt. Diese Zellmodelle sind einer thermodynamischen Analyse zugänglich und ermöglichen eine Beschreibung der kalorischen Eigenschaften der Komponenten im Gemisch. Dabei wurde im besonderen die Wasserkomponente einer Protein-Lösung untersucht. Die Versuche haben ergeben, daß in einer wässrigen Rinderseumalbumin-Lösung etwa 0,29 g Wasser pro Gramm trockenes Protein "kalorisch gebunden" sind. Dieses "kalorisch gebundene" Wasser unterscheidet sich vom freien Wasser dadurch, daß es keinen Phasenübergang vom flüssigen in den festen Zustand aufweist und daß die partielle spezifische Wärme bei einer Temperatur von 25°C etwa 37 % größer ist als die des freien Wassers. Diese "Wasserhülle" um das Proteinmolekül - entsprechend einer Modellvorstellung - ergibt eine monomolekulare Schicht und vergrößert dadurch den Molekülradius des RSA-Moleküls etwa um 10 %. Mit zunehmendem Abstand vom RSA-Molekül nimmt der Einfluß der Wechselwirkungskräfte ab. Die Untersuchungen haben ergeben, daß bis zu einer Entfernung von etwa 20 % des Molekülradius des Rinderseumalbumins die Wassermoleküle unter dem Einfluß der Wechselwirkungskräfte stehen. Für die gesamte um das RSA-Molekül ausgebildete "Wasseratmosphäre" ergibt sich somit ein Wert von 0,54 g Wasser pro Gramm trockenes Rinderseumalbumin.

Die Partialenthalpie des Wassers in wässrigen Proteinlösungen ist unverändert gleich der Enthalpiedifferenz des

freien Wassers. Die Partialenthalpie des Proteins ist dagegen negativ.

Nach Zugabe von Salz in ein Protein-Wasser-Gemisch nimmt die Menge der Lösungsmittel, die unter dem Einfluß der Wechselwirkungskräfte stehen, zu. In einem Protein-Wasser-Gemisch mit einem Salzgehalt von 0,5 Molen pro Liter, beträgt der Anteil des Lösungsmittels, der keinen Phasenübergang mehr aufweist, etwa 0,54 g pro Gramm RSA. Eine Extrapolation in den Bereich der physiologischen Salzkonzentrationen zeigt, daß dieser geringe Salzanteil die Menge des Lösungsmittels, für das kein Phasenübergang mehr nachweisbar ist, nur wenig verändert.

Auffallend dagegen ist das Verhalten des eutektischen Gemisches einer Salzlösung nach Zugabe von Protein. Mit zunehmendem Proteinanteil nimmt die Schmelzenthalpie des eutektischen Gemisches ab. Beträgt in einer 0,5 molaren NaCl-Lösung der Proteinanteil etwa 10 %, so ist kein Phasenübergang mehr nachzuweisen, der einem eutektischen Gemisch zugeordnet werden kann. Werden daher z. B. das Zytoplasma einer Zelle, Erythrozyten oder biologisches Gewebe zur Konservierung eingefroren, so ist bis zu einer Temperatur von etwa -50°C keine Phasenumwandlung eines eutektischen Gemisches zu erwarten, wodurch eine Zellschädigung verursacht werden kann.

Weitere Untersuchungen wurden an menschlichen Erythrozyten durchgeführt. Ein Vergleich der Ergebnisse, die an den Modellsystemen gewonnen wurden, mit denen, die sich aus den Messungen an Erythrozyten ergeben haben, zeigt, daß sich das kalorische Verhalten des Zellinhaltes recht gut durch das kalorische Verhalten einer binären Mischung - einer Protein-Wasser-Mischung - beschreiben läßt. In einem Erythrozyten haben 80 % des Zellwassers die kalori-

schen Eigenschaften des freien Wassers, während etwa 20 % des Zellwassers an die Zellproteine "kalorisch gebunden" sind. Zellen mit einem geringeren Proteingehalt enthalten nur wenig "kalorisch gebundenes" Wasser, der überwiegende Anteil des Wassers ist freies Wasser.

Bei den Untersuchungen an dem Modellsystem Protein-Kochsalz-Wasser-Gemisch konnte gezeigt werden, daß unter dem Einfluß des Rinderserumalbumins das Eutektikum des Salzes verschwindet. Beim Einfrieren von dichtgepackten Erythrozyten im Temperaturbereich von etwa 0°C bis -50°C konnte ebenfalls kein Phasenübergang nachgewiesen werden, der einem Eutektikum zugeordnet werden kann.

Während die Erythrozyten beim Einfrieren oder Auftauen im allgemeinen zerstört werden, kann durch Zugabe von Gefrierschutzmitteln eine Schädigung weitgehend verhindert werden. Bei kalorischen Untersuchungen einer wässrigen Salzlösung mit einem Glyzerinanteil von etwa 47 Volumenprozent ist kein Phasenübergang mehr nachzuweisen. Das Gemisch erstarrt glasartig. Hierbei entfallen 0,72 Gramm Lösungsmittel auf 1 Gramm Glyzerin. Solche Gemische sind in ähnlicher Zusammensetzung Suspensionsmedien für Erythrozyten bei einer Tiefkühlkonservierung.

Die bisher durchgeführten kalorischen Untersuchungen an Erythrozytensedimenten mit Gefrierschutzzusatz zeigen, daß bei einem genügend großen Anteil z. B. von Glyzerin im Suspensionsmedium keine Phasenübergänge mehr bis zu einer Temperatur von -50°C nachzuweisen sind. Werden solche Sedimente aufgetaut, so sind diese Erythrozyten noch intakt und nach Abtrennung des Glyzerins z. B. für Transfusionen geeignet.

Eine Entscheidung darüber, ob für bestimmte Zellen oder

Gewebe bei einer Tiefkühlkonservierung hochmolekulare oder niedermolekulare Gefrierschutzmittel besser geeignet sind, setzt ein Verständnis der Mechanismen der Gefrierschutzmittel voraus. Weitere Untersuchungen haben ein Studium dieser Mechanismen zum Ziel.

6. Literatur

- 1 Adair, G.S., Adair, M.E.:
The density increment of proteins.
Proc. Roy. Soc., London A 90 341 (1947)
- 2 Andronikashvili, E.L., Mrevlishvili, G.M., Privalov, P.L.:
Calorimetric investigation of the state of
tissue water.
In: Kayushin L.P.(Ed.): Water in biological
systems, pp. 67-69.
Übersetzt aus dem Russischen. New York:
Consultants Bureau 1969
- 3 Asahina, E., Shimada, K., Hisada, Y.:
A stable state of frozen protoplasm with
invisible intracellular ice crystals obtained
by rapid cooling.
Exp. Cell Res. 59, 349-358 (1970)
- 4 Berendsen, H.I.C.:
Theoretical and experimental biophysics.
Ed: A cole, Vol. 1 New York: Marcel Dekka
Inc. 1967
- 5 Briggs, D.R.:
Water relationships in colloids. II. "Bound"
Water in colloids.
J.Phy.Chem. 36, 367-386 (1932)
- 6 Brooks, J.:
Bound water in muscle.
J.Gen.Physiol. 17, 783-790 (1934)
- 7 Bull, H.B. and Breese, K.:
Protein hydration, II. Specific heat of egg
albumin.
Arch. Biochem. Biophys. 128, 497-502 (1968)
- 8 Chatteraj, D.K. and Bull, H.B.:
Calorimetric study of water-DNA interactions.
J.Coll.Interf. Sci. 35, 220-226 (1971)
- 9 Dick, D.A.R.:
Cell water.
London: Butterworth 1966 p 36 ff

- 10 Dorsey, N.E.:
Properties of ordinary water-substance.
New York: Reinhold Publishing Corp. 1940
- 11 Eisenberg, D. and Kauzmann, W.:
The structure and properties of water.
At the Clarendon Press 1969
- 12 Erlander, S.:
The structure of water.
Sci. Journal 5A, 60-65 (1969)
- 13 Frank, H.S. and Wen Wen-Yang:
III. Ion-solvent interaction structural aspects of ion-solvent. Interaction in aqueous solutions: A suggested picture of water structure.
Disc. Farad Soc. 24, 133-140 (1957)
- 14 Frank, H.S. and Evans, M.W.:
Free volume and entropy in condensed systems. III. Entropy in binary liquid mixtures; Partial molal entropy in dilute solutions; Structure and thermodynamics in aqueous electrolytes.
J.Chem.Physics, 13, 507-532, (1945)
- 15 Gary-Bobo, C.M., Solomon, A.K.:
Properties of hemoglobin solutions in red cells.
J.gen.Physiol. 52, 825-853 (1968)
- 16 Giauque, W.F., Stont, J.W.:
The entropy of water and the third law thermodynamics. "The heat capacita of ice from 15 to 273°K".
J.Amer.chem.Soc. 58, 1144-1150 (1936)
- 17 Giese, A.C.:
Cell physiology.
3rd edition, Philadelphia-London-Toronto:
W.B.Saunders Company 1968
- 18 Gortner, R.A. and Gortner, W.A.:
The cryoscopic method for the determination of "bound water".
J. Gen.Physiol. 17, 327-339 (1933)

- 19 Grollmann, A.:
The vapour pressures of aqueous solutions
with special reference to the problem of
the state of water in biological fluids.
J.Gen.Physiol. 14, 661-683 (1931)
- 20 Guggenheim, E.A.:
Thermodynamics.
5. Aufl., Amsterdam: North-Holland Publ.
Co. 1967
- 21 Haase, G.:
Thermodynamik der Mischphasen.
Springer Verlag 1956
- 22 Handbook of chemistry and physics:
44 ed, publ. by: The chemical Rubber
Publishing & Co., Cleveland, Ohio
- 23 Hasl, G. und Pauly, H.:
Kalorische Eigenschaften des gebundenen
Wassers in Proteinlösungen.
Biophys. 7, 283-294 (1971)
- 24 Hasl, G. und Pauly, H.:
Über die kalorischen Eigenschaften von ge-
frorenen Erythrozyten.
Biophysik 8, 141-150 (1972)
- 25 Haurowitz, F.:
The chemistry and function of protein.
Sec. ed. New York: Acad. Press 1963
- 26 Hill, A.V.:
The state of water in muscle and blood and
the osmotic behaviour of muscle.
Proc. Royal Soc. London, Ser. B, Vol. CVI.,
477-505 (1930)
- 27 Kistler, S.S.:
The measurement of "bound" water by the
freezing method.
J. Americ.Chem.Soc. Vol. LVIII, 901-907 (1936)
- 28 Klotz, I.M.:
Role of water structure in macromolecules.
Federat.Proc.24 Suppl. 15, S 24- S 33 (1965)

- 29 Kunitz, M., Anson, M.L. and Northrop, J.H.:
Molecular weight, molecular volume, and
hydration of proteins in solution.
J.Gen.Physiol. 17, 365-373 (1933)
- 30 Le Fevre, P.G.:
The osmotically functional water content
of the human erythrocyte.
J.gen.Physiol. 47, 585-603 (1964)
- 31 Ling, G.N.:
A physical theory of the living state:
the association-induction hypothesis.
New York - London: Blaisdell Publ. Co 1962
- 32 Litvan, G.G.:
Mechanism of cryoinjury in biological
systems.
Cryobiol. 9, 182-191 (1972)
- 33 Lovelock, J.E.:
The mechanism of the protective action of
glycerol against haemolysis by freezing and
thawing.
Biochim. Biophys. Acta 11, 28-36 (1953)
- 34 Lovelock, J.E.:
The hemolysis of human red blood-cells
by freezing and thawing.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 10,
414-426 (1953)
- 35 Mazur, P.:
Kinetics of water loss from cells at subzero
temperatures and the likellihood of intra-
cellular freezing.
J.gen.Physiol. 47, 347-369 (1963)
- 36 Mazur, P.:
Basic problems in cryobiology. Advances in
Cryogenic Engineering 9, Plenum Press 1964
- 37 Mazur, P.:
Physical and chemical basic of injury in
single-celled micro-organisms subjected to
freezing and thawing.
In: Meryman (Ed.): Cryobiology, Academic
Press 1966

- 38 Mazur, P.:
Cryobiology: The freezing of biological systems.
Science 168, 939-949 (1970)
- 39 McMeeking, T.L., Eoves, M.L. and Hipp, N.J.:
Composition and hydration of protein crystal in salt solution.
J.Am.Chem.Soc., 76, 407-413 (1954)
- 40 Meryman, H.T.(Ed.):
Cryobiology.
Acad. Press 1966 London - New York
- 41 Milbers, P. und Hasl, G.:
Bestimmung der partiellen spezifischen Wärmen eines RSA-Wasser-Gemisches.
Vortrag auf der gemeinsamen Jahrestagung 1972 der DGB und der DGMP in Erlangen 1972
- 42 Milbers, P.:
Dissertation, Univ. Erlangen-Nürnberg 1973
- 43 Morris, G.J. and Farrant, J.:
Interactions of cooling rate and protective additive on the survival of washed human erythrocytes frozen to -196°C .
Cryobiol. 9, 173-181 (1972)
- 44 Mrevlishvili, G.M., Privalov, P.L.:
Calorimetric investigation of macromolecular hydration.
In: Kayushin, L.P.(Ed.): Water in biological systems, pp. 63 - 66. Übersetzt aus dem Russischen. New York: Consultants Bureau 1969
- 45 Ørskov, S.L.:
The volume of erythrocytes at different osmotic pressure. Further experiments on the influence of lead on the permeability of cations.
Acta physiol. scand. 12, 202-212 (1946)
- 46 Parpart, A.K., Ballantine, R.:
Hematocrit determination of relation cell volume.
Science 98, 545 only (1935)

- 47 Parpart, A.K., Shull, I.C.:
Solvent water in the normal mamalian erythrocyte.
J.cell.comp.Physiol. g, 137-150 (1935)
- 48 Passow, H.:
Ion and water permeability of the red blood cell.
In: Bishop, C., Surgenor, D.M.(Eds.): The red blood cell. New York: Academic Press 1964
- 49 Pauly, H., Schwan, H.P.:
Dielectric properties and ion mobility in erythrocytes.
Biophy. J. 6, 621-639 (1966)
- 50 Pauly, H.:
Thermodynamische und elektrische Eigenschaften des Zytoplasmas. Fortschritte der experimentellen und theoretischen Biophysik (Beier, W., Hrsg.).
Im Druck
- 51 Pfister, H.:
Das chemische Potential von Kaliumchlorid in konzentrierten Proteinlösungen - ein Beitrag zum Verständnis des thermodynamischen Zustandes des Zytoplasmas.
Dissertation, Univ. Erlangen-Nürnberg 1971
- 52 Ponder, E.:
Hamolysis and related phenomena.
New York: Grunde & Stratton 1948
- 53 Ponder, E.:
Anomalous features of the loss of K^+ from human red cells: Results of extended observations.
J.Gen.Physiol. 34, 359-372 (1951)
- 54 Rauen, H.M. (Hrsg):
Biochemisches Taschenbuch, Teil II.
Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964
- 55 Robinson, W.:
Free and bound water determinations by the heat of fusion of ice method.
J.Biol.Chem. 92, 699-709 (1931)

- 56 Rosen, D.:
Dielectric properties of protein powders
with adsorbed water.
Tran.Faraday Soc. 59, 2179-2191 (1963)
- 57 Rowlinson, J.S.:
Liquid and liquid mixtures.
2th impression (revised) 1971; Butterworth
& Co. (Publisher) Ltd. 1969
- 58 Rubner, M.:
Über die Wasserbindung in Kolloiden mit be-
sonderer Berücksichtigung des quergestreiften
Muskels.
Abhandlung der preußischen Akademie der
Wissenschaften, NR 1, 1-70, Berlin 1922
- 59 Samoilov, O.Ya.:
Structure of aqueous electrolyte solutions
and the hydration of ions.
Übersetzt aus dem Russischen von Ives D.J.G.,
Consultants Bureau, New York 1965
- 60 Savitz, D., Sidel, V.W., Solomon, A.K.:
Osmotic properties of human red cells.
J.gen.Physiol. 48, 79-94 (1964)
- 61 Schwan, H.P.:
Electrical properties of bound water.
Ann. Rev. N.Y. Acad.Sci. 125, 344-354 (1965)
- 62 Sinanoglu, O. and Abdunur, S.:
Effect of water and other solvents on the
structure of biopolymers.
Federat. Proc. 24 Suppl. 12, S 12 -
S 23 (1965)
- 63 Spector, W.S.(Ed):
Handbook of biological data.
Philadelphia: Saunders Comp. 1956
- 64 Tanfort, Ch.:
The structure of water and of aqueous
solutions.
In: Temperature, Part 3 pp. 123-129.
London: Reinhold Publishing Corp., Chapman
& Hall Ltd. 1963

- 65 Tanfort, Ch.:

The interpretation of hydrogen ion interaction curves of proteins.
Adv. Protein. Chem. 17, 69-165 (1962)

- 66 Thoenes, F.:

Untersuchungen zur Frage der Wasserbindung in Kolloiden und tierischen Geweben.
Biochem. Z. 157, 174-186 (1925)

- 67 Troshin, A.S.:

Problems of cell permeability.
Oxford: Pergamon Press 1966

- 68 Wallach, S., Zemp, J.W., Cavins, J.A., Jenkins, L.J.,
Bethea, M., Freshette, L., Haynes, L.L., Tullis, J.L.:

Cation flux and electrolyte composition of frozen-deglycerolized blood.
Vol. 20, 344-353 (1962)

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990